

Université de Montréal

PKC β 1 intervient dans l'action d'une concentration
élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène
et l'hypertrophie des IRPTC

par
Annie Calvé

11634215

Département de médecine
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biomédicales

Août, 2004

©, Annie Calvé, 2004



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

PKC β 1 intervient dans l'action d'une concentration
élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène
et l'hypertrophie des IRPTC

présenté par :
Annie Calvé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Janos G. Filep
président-rapporteur

John S. D. Chan
directeur de recherche

Marie-Josée Hébert
codirecteur

Lise Coderre
membre du jury

Résumé en français

Mots clés : IRPTC, PKC β 1, angiotensinogène, hypertrophie, p27^{Kip1}.

Il est connu qu'une concentration élevée en glucose stimule l'expression du gène de l'angiotensinogène et l'hypertrophie cellulaire des IRPTC (ZHANG 1999b, 2000 et 2001). Cette étude a pour but de vérifier si l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression de l'angiotensinogène et l'hypertrophie des cellules de tubules proximaux de rat immortalisées (IRPTC) passe par l'activation de l'isoforme β de la protéine kinase C (PKC). Les IRPTC ont été transformées par un plasmide qui exprime la protéine dominante-négative de PKC β 1. L'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène a été déterminée par RT-PCR. L'hypertrophie cellulaire étant mesurée par l'expression de la protéine p27^{Kip1}, qui est déterminée par un *Western*. Les résultats obtenus démontrent que l'expression de protéines dominantes-négatives de PKC β 1 bloque l'effet stimulant d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène ainsi que sur l'hypertrophie des IRPTC. Ce qui démontre que l'action d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène et l'hypertrophie des IRPTC passe, au moins en partie, par PKC β 1.

Résumé en anglais

Keywords : IRPTC, PKC β 1, angiotensinogen, hypertrophy, p27^{Kip1}.

We have previously reported that high glucose (25 mM) stimulates the expression of the angiotensinogen gene and cellular hypertrophy in IRPTC (ZHANG 1999b, 2000, and 2001). In the present study, we investigated whether the stimulatory effect of high glucose on angiotensinogen, as well as IRPTCs hypertrophy, is mediated, at least in part, via the activation of the protein kinase C β 1 (PKC β 1) isoform. IRPTCs were stably transfected with a dominant negative PKC β 1 (DN-PKC β 1) cDNA. Angiotensinogen mRNA expression was determined by a specific RT-PCR. Cell hypertrophy was assessed by cellular p27^{Kip1} protein levels. Our results revealed that the stable transfer of DN-PKC β 1 blocked the stimulatory effect of high glucose on angiotensinogen mRNA expression, as well as IRPTC hypertrophy. These data demonstrate that the effect of high glucose on angiotensinogen gene expression and induction of IRPTC hypertrophy is mediated, at least in part, via PKC β 1 activation.

Table des matières

Résumé en français.....	iii
Résumé en anglais.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
1. Introduction.....	1
1.1 Le diabète.....	1
1.2 La néphropathie diabétique.....	2
2. Revue de la littérature.....	4
2.1 Le rein et la fonction rénale.....	4
2.1.1 La fonction du rein.....	4
2.1.2 La structure du rein.....	4
2.1.3 La structure et la fonction du néphron.....	6
2.2 Le système rénine-angiotensine.....	10
2.2.1 La rénine.....	11
2.2.2 L'angiotensinogène.....	11
2.2.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	12
2.2.4 L'angiotensine II.....	12
2.2.5 Les récepteurs de l'angiotensine.....	13
2.2.6 Les systèmes rénine-angiotensine locaux.....	15
2.3 La néphropathie diabétique.....	16
2.3.1 Les traitements.....	17
2.3.2 Les mécanismes de son évolution.....	18
2.3.3 L'activation du système rénine-angiotensine.....	21
2.3.4 L'hypertrophie, la prolifération et l'apoptose.....	22
2.4 Les protéines kinases C.....	25
2.4.1 Structure et activation.....	25
2.4.2 Expression et activation dans le rein.....	28
2.4.3 Rôle dans la néphropathie diabétique.....	29
2.5 L'élément de réponse à l'insuline et les IRE-BP.....	31
2.6 Les IRPTC.....	32
3. Hypothèse et buts.....	34
4. Méthodes et résultats.....	35
4.1 Établissement de la lignée cellulaire DN-PKC β 1 dans les IRPTC.....	35
4.2 Effet du glucose et de DN-PKC β 1 sur l'expression de l'angiotensinogène.....	40
4.3 Implication de PKC β 1 dans l'hypertrophie des IRPTC.....	46
5. Discussion et conclusion.....	50
Bibliographie.....	56
Annexe 1.....	xi

Liste des tableaux

Tableau I : Les effets de l'angiotensine II selon le type de cellule rénale.....	22
Tableau II : Séquences des oligonucléotides utilisés pour déterminer l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène.....	xi

Liste des figures

Figure 2.1 : Coupe transversale d'un rein.....	5
Figure 2.2 : Disposition schématique des néphrons superficiels (à droite) et profonds (à gauche).....	6
Figure 2.3 : Le système rénine-angiotensine.....	10
Figure 2.4 : Structure des PKC.....	26
Figure 4.1 : <i>Northern</i> pour la sélection des clones DN-PKC β 1.....	36
Figure 4.2 : <i>Northern</i> pour la sélection des clones DN-PKC β 1.....	37
Figure 4.3 : Immunoprécipitation pour la confirmation des clones DN-PKC β 1.....	38
Figure 4.4 : <i>Western</i> pour la confirmation des clones DN-PKC β 1.....	39
Figure 4.5 : Expression de base de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les différents clones d'IRPTC déterminée par RT-PCR.....	41
Figure 4.6 : Effet de la concentration en glucose sur l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les IRPTC contrôles (pcDNA3.1).....	43
Figure 4.7 : Effet de la concentration en glucose sur l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les clones DN-PKC β 1.....	44
Figure 4.8 : Expression de p27 ^{Kip1} dans les IRPTC contrôles.....	47
Figure 4.9 : Expression de p27 ^{Kip1} dans les clones DN-PKC β 1.....	48

Liste des abréviations

°C.....	Degré Celsius
ACE.....	Enzyme de conversion de l'angiotensine (de l'anglais <i>Angiotensin converting enzyme</i>)
ADN.....	Acide désoxyribonucléique
ADNc.....	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN.....	Acide ribonucléique
ARNm.....	ARN messenger
ATP.....	Adénosine triphosphate
CAGE.....	Enzyme génératrice d'angiotensine II sensible au chymostatin (de l'anglais <i>Chymostatin-sensitive Angiotensin II-Generating Enzyme</i>)
DIG.....	Digoxigénine
DMEM.....	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (de l'anglais <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DN-PKC β 1.....	Dominant-négatif-PKC β 1
DN-PKC β 17.....	IRPTC transformées avec le plasmide DN-PKC β 1 clone numéro 17
DN-PKC β 20.....	IRPTC transformées avec le plasmide DN-PKC β 1 clone numéro 20
DN-PKC β 24.....	IRPTC transformées avec le plasmide DN-PKC β 1 clone numéro 24
EDTA.....	Acide éthylènediaminetétraacétique (de l'anglais <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS.....	Sérum fœtal de bovin (de l'anglais <i>Fœtal Bovine Serum</i>)
h.....	Heure
HA.....	Héماغlutinine du virus de l'influenza humain
IRPTC.....	Cellules de tubules proximaux de rat immortalisées (de l'anglais <i>Immortalized Rat Proximal Tubular Cells</i>)
M.....	Molaire
MAPK.....	Protéine kinase activée par le mitogène (de l'anglais <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
mg.....	Milligramme
mM.....	Millimolaire
N.....	Normale
PCR.....	Réaction de polymérisation en chaîne (de l'anglais <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKC.....	Protéine kinase C
PKC β 1.....	PKC isoforme bêta 1
PVDF.....	Polyvinylidène fluoride

RT-PCR.....	Réaction de polymérisation en chaîne avec transcription inverse (de l'anglais <i>Reverse transcription polymerisation chain reaction</i>)
SDS-Page.....	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (de l'anglais <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SSC.....	S solution saline au citrate de sodium (de l'anglais <i>saline sodium citrate</i>)
TBS-T.....	Saline tamponnée au tris additionnée de 0,1 % de Tween-20 (de l'anglais <i>Tris-buffered saline with 0,1% Tween-20</i>)
<i>t</i> -PA	Activateur tissulaire de plasminogène (de l'anglais <i>Tissue-Plasminogen Activator</i>)
µg/ml.....	Microgramme par millilitre
µg.....	Microgramme

À Etienne et Ariane

1. Introduction

1.1 Le diabète

Le diabète est un syndrome de plus en plus courant qui affecte principalement les populations industrialisées. Il est caractérisé par une augmentation du volume urinaire, une augmentation de la soif, ainsi qu'une déshydratation. Il est divisé en deux groupes : le diabète insipidus et le diabète mellitus. Le diabète insipidus, pour sa part, est un désordre endocrinien causé par un manque de production ou un défaut d'action de l'hormone antidiurétique (ou vasopressine) (LACZIF 2002). Par contre, le diabète mellitus (ou diabète sucré) est un groupe de désordres d'ordre métabolique caractérisé par un taux de glucose sanguin élevé, dans lesquels l'insuline, sécrété par les cellules β du pancréas, joue un rôle central. Le diabète mellitus se sépare en deux catégories : le diabète de type 1 et celui de type 2. Comme le diabète de type 2 compte pour environ 90% des cas de diabète mellitus, c'est souvent à ce dernier que l'on réfère lorsque l'on parle de diabète dans le langage populaire. Le diabète de type 1, ou insulino-dépendant, est causé par une réaction auto-immune qui détruit les cellules β du pancréas. Ainsi, il y a une déficience totale de la production d'insuline. Par contre, le diabète de type 2, ou non insulino-dépendant, découle d'une résistance des cellules à l'action de l'insuline. Dans ce cas, les mécanismes de compensation qui sont activés par les cellules β pour sécréter plus d'insuline ne sont pas suffisant pour maintenir la glycémie dans les normes physiologiques (ZIMMET 2001).

Le diabète mellitus est un syndrome qui occupe une place de plus en plus importante dans la gestion de la santé mondiale. En effet, les prévisions actuelles envisagent une augmentation de 46% des cas mondiaux. Ils devraient passer de 151 millions en 2000 à 221 millions en 2010 et aucune stabilisation du nombre de cas n'est prévue à court ou moyen terme (ZIMMET 2001). La multiplication constante des cas de diabète entraîne également une multiplication des complications qui lui sont

associées. Parmi celle-ci se trouve la néphropathie diabétique qui mène aux maladies rénales de phase terminale (*end stage renal disease*).

1.2 La néphropathie diabétique

Le diabète mellitus est la première cause de maladies rénales de phase terminale qui sont l'aboutissement des néphropathies diabétiques. Le bon contrôle de la glycémie est essentiel pour diminuer les risques de développer une néphropathie diabétique. Celles-ci sont des manifestations structurales et fonctionnelles des maladies vasculaires dans le rein lors du diabète. Elles sont causées en partie par l'hyperglycémie et la glycolysation non enzymatique des lipoprotéines (MARTINS 2001).

Les néphropathies diabétiques sont présentes chez un tiers des patients diabétiques. De plus, elles comptent pour près de la moitié des nouveaux cas de maladie rénale de phase terminale et sont la plus importante cause de décès chez les personnes souffrant de diabète. Le diabète mellitus en combinaison avec l'hypertension augmente de cinq à six fois le risque de développer une maladie rénale de phase terminale comparativement aux patients souffrant d'hypertension seulement. De plus, environ 80% des patients avec une néphropathie diabétique souffrent également d'hypertension (MOGENSEN 1991). Plusieurs autres facteurs de risque sont associés aux néphropathies diabétiques, dont entre autre l'âge avancé, le statu ménopausé, la consommation de cigarettes, le haut niveau de résistance à l'insuline et l'hypercholestérolémie (OLIVARIUS 1993, RAVID 1998).

Compte tenu de l'augmentation constante des cas de diabète, ainsi que des cas d'hypertension, jumelé à des facteurs de risques de plus en plus présent dans la société, le nombre de cas de néphropathie diabétique ne cesse de croître. Les patients ayant une maladie rénale de phase terminale causée par le diabète sont traités

majoritairement par hémodialyse (67.7%) ou par dialyse péritonéale (13.2%) ou encore par une transplantation rénale (19.1 %) (FRIEDLANDER 1997). Toutes ces techniques sont extrêmement coûteuses. Donc, en diminuant le nombre de patients ayant une néphropathie diabétique, le nombre de décès, ainsi que les coûts de soin lié au diabète vont diminuer. Pour atteindre ces buts, différentes approches doivent être utilisées. Premièrement, il est mieux de prévenir l'apparition de la maladie que d'essayer de la guérir. Pour ce faire, une bonne hygiène de vie est nécessaire, surtout pour les patients souffrant de diabète et qui présentent également un ou plusieurs facteurs de risque supplémentaires. La prévention passe donc par l'exercice, un bon contrôle de la glycémie, un bon régime alimentaire et un mode de vie sain (MARTINS 2001). De plus, dans l'état actuel des connaissances, quelques types de médicament peuvent être employés pour prévenir l'apparition de la néphropathie diabétique. Entre autre, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ont déjà prouvé leur efficacité (LEWIS 1993) et plus récemment, les bloqueurs du récepteur de l'angiotensine semblent prometteurs (MARTINS 2001). L'utilisation des ces deux types de médicament découle directement de la connaissance des mécanismes menant à la maladie. En effet, c'est en connaissant les modifications apportées par la maladie que l'on peut les contrer par une action ciblée. Ainsi la compréhension de tous les mécanismes moléculaires menant à son apparition est importante pour la prévention ainsi que pour une guérison future de la néphropathie diabétique. Il est donc crucial d'étudier tous les mécanismes liés de loin ou de près au diabète, à l'augmentation de la glycémie, à la résistance à l'insuline ainsi qu'à l'apparition de la néphropathie diabétique. En permettant le développement de nouvelles thérapies, ce sont tous les coûts liés au diabète qui vont diminuer, tant monétaire qu'humain.

2. Revue de la littérature

2.1 Le rein et la fonction rénale

2.1.1 La fonction du rein

Le rein est un organe essentiel du corps humain, car il a une fonction primordiale en ce qui a trait au maintien de l'équilibre homéostatique. C'est-à-dire, le maintient constant du volume, de la tonicité et de la composition des liquides corporels. Il conserve à l'intérieur des limites physiologiques la balance externe nette en eau et en divers électrolytes comme le sodium, le potassium, les ions d'hydrogène et les ions comme le calcium, le phosphate et le magnésium (GOUGOUX 1999). Le maintien de cet équilibre permet de créer un environnement le plus stable possible pour les cellules. Le rein débarrasse également le corps de ses déchets comme l'urée et la créatinine, en plus des substances ioniques exogènes comme les médicaments (GOUGOUX 1999). Dans cette optique, le rein joue un rôle primordial. Il sert d'unité de filtration et élimine les déchets issus du métabolisme. Il contrôle également l'osmolarité du milieu, ainsi que le volume, la balance acido-basique et la composition ionique des fluides extra-cellulaires. Ce qui permet indirectement le maintien de ces paramètres dans les cellules (LOTE 2000). De plus, le rein sécrète différentes hormones qui contribuent à la régulation de la pression artérielle systémique, à la production de globules rouges et la minéralisation osseuse.

2.1.2 La structure du rein

Les deux reins humains sont des organes situés dans la partie postérieure de la cavité abdominale de chaque cotés de la colonne vertébrale et ils ont la forme de gros haricot. Chez l'adulte, ils mesurent en moyenne 12 cm de longueur, 6 cm de largeur

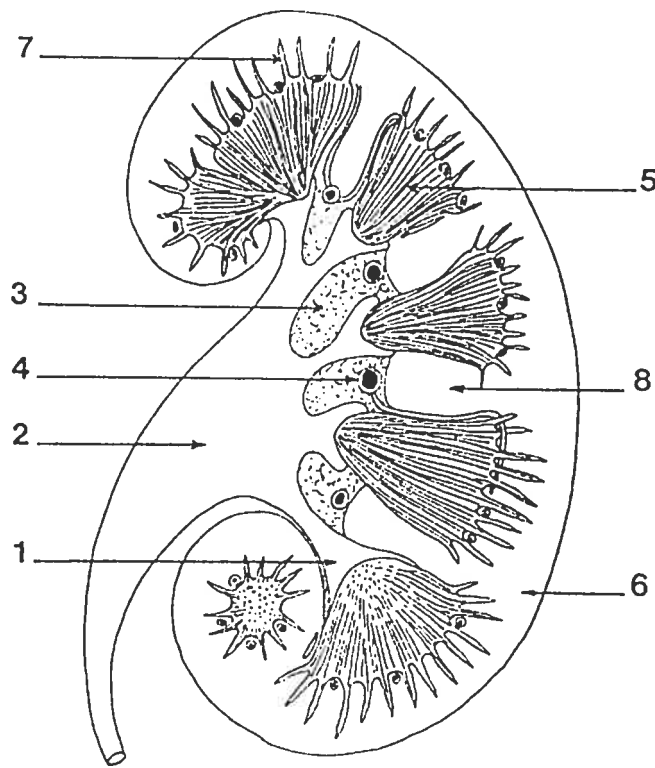


Figure 2.1 : Coupe transversale d'un rein. 1 : calice; 2 : bassinet; 3 : graisse du sinus; 4 : artère interlobaire; 5 : pyramide de Malpighi; 6 : cortex; 7 : rayon médullaire; 8 : colonne de Bertin (Tirée de PAILLARD 1992).

et 3 cm d'épaisseur pour un poids d'environ 150 g (GOUGOUX 1999). Chaque rein est entouré d'une capsule fibreuse et est composé de deux régions : le cortex à l'extérieur et la médulla à l'intérieur. La médulla se divise en médulla interne et externe qui est elle-même composée d'une bande interne et externe. La médulla de chaque rein est composée d'environ douze pyramides de Malpighi (PAILLARD 1992). Ce sont des structures dont la base est située à la jonction corticomédullaire et dont le sommet se jette dans le calice qui est lié au bassinet. La portion inférieure du bassinet donne son origine à l'uretère qui se termine dans la vessie. L'unité fonctionnelle, et structurale, du rein est le néphron. Ils sont plus d'un million par rein.

2.1.3 La structure et la fonction du néphron

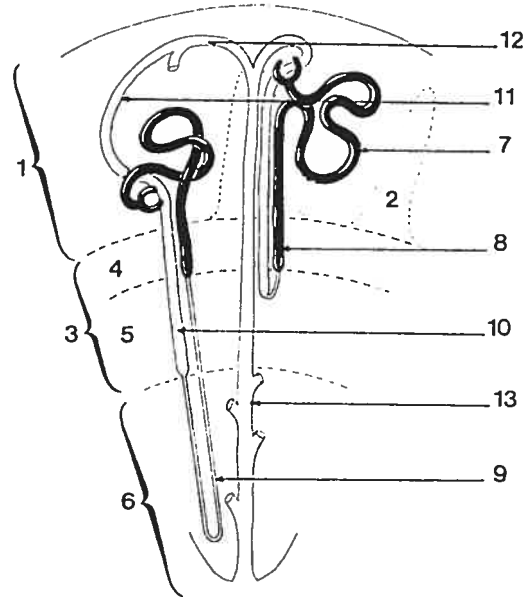


Figure 2.2 : Disposition schématique des néphrons superficiels (à droite) et profonds (à gauche). 1 : cortex; 2 : rayon médullaire; 3 : médulla externe avec sa couche externe (4) et sa couche interne (5); 6 : médulla interne; 7 : tubule contourné proximal; 8 : tubule droit proximal; 9 : tubule intermédiaire; 10 : tubule droit distal; 11 : tubule contourné distal; 12 : tubule connecteur formant une arcade; 13 : tubule collecteur (Tirée de PAILLARD 1992).

2.1.3.1 Le corpuscule rénal

Le corpuscule rénal est formé de deux structures, le glomérule et la capsule de Bowman. Le glomérule est constitué d'un réseau de capillaires sanguins situés dans le cortex du rein et entourés par une mince couche de cellules endothéliales, de cellules mésangiales, de cellules épithéliales viscérales (ou podocytes) et de cellules épithéliales pariétales. La fonction du glomérule est de filtrer le plasma qui entre dans le néphron. En effet, la lumière des capillaires du glomérule est recouverte de l'endothélium qui est lui-même recouvert de la membrane basale glomérulaire qui est une structure composée de collagène et d'autres glycoprotéines chargées négativement. Vient ensuite la couche de l'épithélium qui forme la couche viscérale de la capsule de Bowman (LOTE 2000). Ces trois couches, et principalement la membrane basale glomérulaire, servent de filtre aux molécules qui passent vers

l'espace urinaire de Bowman. La taille, la charge électrique et la forme des molécules déterminent si elles peuvent passer ou non. Les molécules de faible poids moléculaire peuvent passer, comme l'urée et l'insuline. Par contre celles de haut poids moléculaire demeurent dans le capillaire. Il en est de même pour les molécules chargées négativement qui sont repoussées par la membrane basale glomérulaire. Le filtrat glomérulaire est donc composé principalement de l'eau du plasma et des constituants non protéiques du sang. Il ne contient pas d'acides gras, car ils sont liés dans le sang à des protéines qui les empêchent de traverser la barrière glomérulaire. De plus, les hormones stéroïdiennes et les médicaments liés aux protéines plasmatiques ne peuvent pas être filtrés par les reins et seulement 60% du calcium plasmatique peut passer dans le filtrat. Ce filtrat est ensuite acheminé à travers le tubule rénal, où la réabsorption et la sécrétion se chargent de déterminer la composition définitive de l'urine. Cela se fait par le transport de différentes substances entre le liquide tubulaire et le sang des capillaires péri-tubulaires (GOUGOUX 1999).

L'appareil juxtaglomérulaire est localisé au pôle vasculaire du glomérule. Il est composé d'une partie tubulaire et d'une partie vasculaire. Cette dernière est composée de la portion terminale de l'artériole afférente, de la portion initiale de l'artériole efférente et de la région mesangiale extraglomérulaire. La partie tubulaire est la *macula densa* et c'est la portion en contact avec la composante vasculaire (BARAJAS 1989, LOTE 2000). Dans les parois de l'artériole afférente se trouvent des cellules spécialisées : les cellules granulaires. Elles libèrent une enzyme très importante : la rénine. Leur aspect granuleux est justement dû à l'accumulation de granules contenant les réserves de rénine.

2.1.3.2 Le tubule

Le tubule rénal est divisé en quatre parties : le tubule proximal, les branches fines de l'anse de Henlé (ou tubule intermédiaire), le tubule distal et le tubule collecteur.

Le tubule proximal est composé chez la plupart des mammifères de trois segments : S1, S2 et S3. Le tubule contourné proximal (ou *pars convoluta*) (figure 2.2 #7) qui est la partie contournée d'un tubule proximal comprend le segment S1 et une partie du segment S2. Il est placé de façon parallèle à la surface du rein. Le tubule droit proximal (ou *pars recta*) (figure 2.2 #8), qui est la partie droite du tubule proximal, est composé de la fin du segment S2 et du segment S3. Il se déploie de façon perpendiculaire à la surface du rein (GOUGOUX 1999). Les cellules de tubule contourné proximal et celles du tubule droit proximal ont différentes structures et des cellules de type intermédiaires font le pont entre les deux types. Dans le tubule contourné proximal les cellules comportent plus de microvilosités du côté luminal et ont plus de mitochondries que dans le tubule droit proximal. La fonction de transport des tubules proximaux est principalement accomplie par le tubule contourné proximal.

Les branches fines de l'anse de Henlé (ou tubule intermédiaire) (figure 2.2 #9) commencent à la transition entre les tubules à parois épaisses et ceux à parois minces. La branche descendante fine descend dans la médulla. Elle est perméable à l'eau, mais a une faible perméabilité au chlorure de sodium. Ce qui permet à l'eau d'être extraite du fluide présent dans le tubule à mesure qu'il descend vers l'interstice hypertonique de la médulla. La branche ascendante fine remonte vers la médulla externe dans les néphrons qui possèdent de longues anses de Henlé. Elle est largement imperméable à l'eau et est hautement perméable au chlorure de sodium. Le sel diffuse ainsi hors du tubule. Donc, les branches fines de l'anse de Henlé jouent un rôle important dans le maintien du statu hypertonique de l'interstice médullaire et dans la livraison d'un fluide dilué aux tubules distaux. Le fluide qui entre dans l'anse de Henlé est isotonique par rapport au plasma, alors que celui qui en sort pour entrer dans les tubules distaux, est hypotonique (LOTE 2000).

Le tubule distal comprend pour sa part une portion droite (figure 2.2 #10), la branche ascendante large de l'anse de Henlé, qui est elle-même composée d'une partie médullaire et d'une partie corticale. Une autre portion du tubule distal est le tubule contourné distal (figure 2.2 #11) qui se situe de façon parallèle à la surface du rein. Et finalement, le tubule connecteur formant une arcade (ou *macula densa*) (figure 2.2 #12) qui est situé à la fin de la branche ascendante large de l'anse de Henlé. Le tubule distal contribue de façon importante à la réabsorption rénale du sodium et du chlore et à la sécrétion du potassium.

Le tubule collecteur (figure 2.2 #13) est composé du tubule connecteur, du tubule collecteur cortical et des tubules collecteurs médullaires externe et interne. L'épithélium du tubule collecteur est constitué de deux types cellulaires. Les cellules principales, ou claires, servent à la réabsorption du sodium et à la sécrétion du potassium. Les cellules intercalaires, ou foncées, servent à l'acidification de l'urine et sont de deux types. Celles du type A sécrètent des protons et absorbent le bicarbonate. Alors que c'est l'inverse pour celles du type B qui sont beaucoup moins nombreuses. Le tubule collecteur est relativement imperméable à l'eau, mais la perméabilité à cette dernière est augmentée par l'hormone antidiurétique. Cette hormone mène à la concentration de l'urine en permettant l'abstraction de l'eau par osmose dans l'interstice.

Il y a deux types de néphrons qui se distinguent par la longueur de leurs anses de Henlé (courte ou longue). Les sept huitièmes de la population de néphrons sont avec des anses de Henlé courtes et proviennent de glomérules situés dans la partie superficielle ou moyenne du cortex. L'anse de Henlé de ces néphrons fait demi-tour dans la médulla externe. Par contre, les néphrons dont l'anse de Henlé est longue tirent leur origine des glomérules situés profondément dans le cortex, près de la jonction cortico-médullaire. L'anse de Henlé de ces néphrons juxtamédullaires est beaucoup plus longue et retourne à divers niveaux dans la médulla interne.

2.2 Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine a pour objectifs principaux le maintien du tonus vasculaire et le maintien de l'homéostasie optimale de l'eau et du sel. La suractivation du système rénine-angiotensine a des conséquences pathologiques, comme la néphropathie diabétique, l'hypertension, l'hypertrophie du ventricule gauche du cœur, l'athérosclérose coronarienne et l'infarctus du myocarde. En plus des effets hémodynamiques, le système rénine-angiotensine peut avoir un rôle critique dans l'activation du système nerveux sympathique, la progression de l'athérosclérose, le dérèglement des fonctions endothéliales et l'inhibition du système fibrinolytique (PERAZELLA 03). Cela en fait donc un système très important.

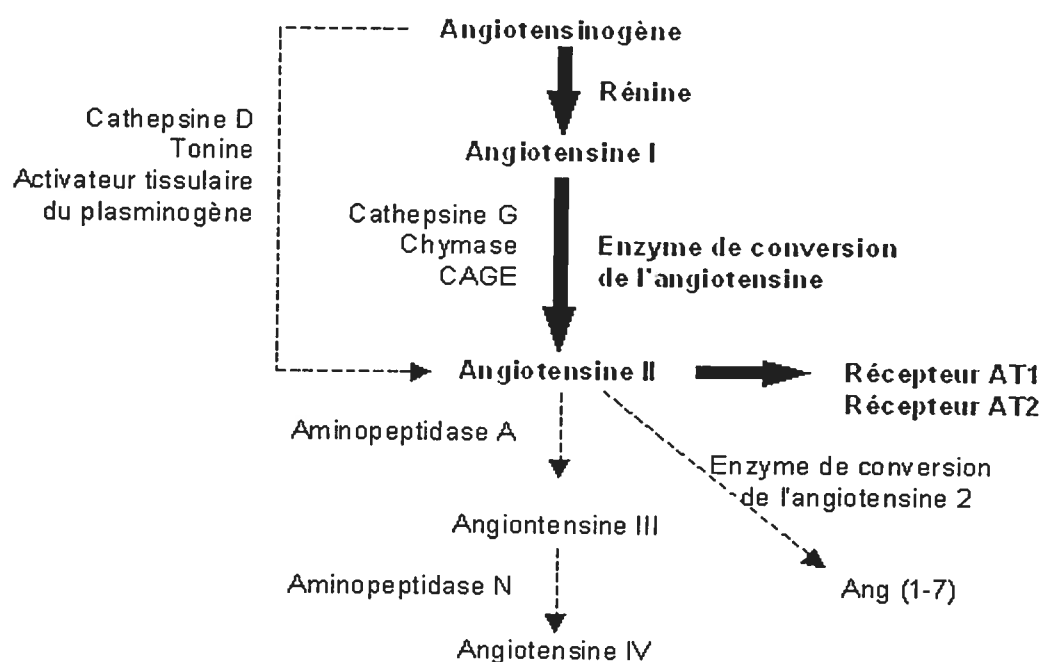


Figure 2.3 : Le système rénine-angiotensine. La voie classique est en gras, alors que les voies alternatives pour la production de l'angiotensine II sont montrées à l'aide de flèches pointillées. Structures de l'Angiotensinogène et de l'angiotensine I à IV respectivement : $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$ et $\text{NH}_2\text{-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$, et structure de l'Ang (1-7) : $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-COOH}$. (Adaptée de LAVOIE 2003 et ZISMAN 2005)

Le système rénine-angiotensine est à la base très simple. Il est composé de l'angiotensinogène qui est une glycoprotéine produite dans le foie. Elle est clivée par la rénine en angiotensine I qui est à son tour clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine en angiotensine II, qui est la substance active de ce système. Il y a deux récepteurs principaux pour l'angiotensine II, AT₁ et AT₂. Il existe également des systèmes rénine-angiotensine locaux qui sont tissus spécifiques. C'est le cas, entre autre, pour le rein (PERAZELLA 2003). D'autres voies moins communes existent également pour produire l'angiotensine II (LAVOIE 2003).

2.2.1 La rénine

La rénine est une glycoprotéine avec un poids moléculaire de 37 à 40 kDa qui fait partie de la famille des protéases aspartiques (MORRIS 1984, LAVOIE 2003). Les cellules productrices de rénine dans l'appareil juxta-glomérulaire du rein sont la partie la plus importante du système rénine-angiotensine systémique hormonal. La sécrétion de rénine est principalement influencée par le contenu en sodium du corps, qui contrôle le volume de la circulation sanguine (LOTE 2000). En effet, une diminution de ce volume induit des changements physiologiques qui induisent à leur tour la sécrétion de la rénine. Ces changements sont la diminution de la pression dans l'artère rénale (qui est mesurée par des barorécepteurs vasculaires) (TOBIAN 1962), l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (via les récepteurs β -adrénergiques) (EHMKE 1989), un signal de la *macula densa* (TAUGNER 1982), ainsi que d'autres facteurs humoraux. L'angiotensine II inhibe la relâche de la rénine par une action directe sur les cellules juxtaglomérulaires (VANDER 1967).

2.2.2 L'angiotensinogène

L'angiotensinogène est une glycoprotéine produite principalement dans le foie et qui est relâchée dans la circulation sanguine. Elle a un poids moléculaire qui varie de 56

à 60 kDa. C'est la prohormone de l'angiotensine et le seul substrat connu pour la rénine. La synthèse de l'angiotensinogène dans le foie est régulée par les glucocorticoïdes, l'estrogène, l'hormone thyroïdienne et l'angiotensine II. Ce changement d'expression se produit au niveau de l'ARNm ainsi qu'au niveau de la protéine (MENARD 1993).

2.2.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, de l'anglais *Angiotensin Converting Enzyme*), est produite et localisée principalement dans les poumons, mais aussi à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux, et à la membrane cellulaire des reins, du cœur et du cerveau (PERAZELLA 2003). C'est une carboxypeptidase dipeptidique (LAVOIE 2003). Son poids moléculaire varie de 140 à 170 kDa. Elle est constituée de deux domaines homologues entourés par de courtes régions non-homologues. Elle possède deux sites enzymatiquement actifs, un à chaque bout. Chaque site fonctionne indépendamment et peut cliver l'angiotensine I en angiotensine II.

2.2.4 L'angiotensine II

L'angiotensine II est un octapeptide. Elle est la composante du système rénine-angiotensine qui est biologiquement active. L'angiotensine II est produite dans plusieurs organes via la livraison systémique de l'angiotensine I, qui est la composante circulante du système rénine-angiotensine (PERAZELLA 2003). Les effets de l'angiotensine II sont très variés. Cela passe par des effets cardiovasculaires, endocriniens, métaboliques ou comportementaux. L'effet le plus important est probablement la vasoconstriction. Un autre effet qui est également important est le relâchement de l'aldostérone. Cette dernière cause la rétention du sodium par les reins. Cela permet à l'angiotensine II de jouer un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'hypertension (REID 1985). Toutes les actions de l'angiotensine II passent par des récepteurs spécifiques localisés sur les membranes

des cellules cibles. La vasoconstriction médiée par l'angiotensine II s'effectue par la stimulation des récepteurs AT1 présents dans la vascularisation et par l'augmentation du tonus sympathique et la relâche de vasopressine (LAVOIE 2003). De façon chronique, l'angiotensine II régule la pression sanguine en modulant le sodium et la réabsorption de l'eau au niveau du rein, soit directement par la stimulation des récepteurs AT1 dans le rein, ou indirectement en stimulant la production et la relâche de l'aldostérone par les glandes surrénales, ou en stimulant la sensation de soif via le système nerveux central. Sa dégradation par les aminopeptidases A et N produit l'angiotensine III et IV respectivement (LAVOIE 2003).

La fonction classique de l'angiotensine II est de maintenir le volume extracellulaire et de la pression sanguine lors d'une diminution de volume (TOKE 2001). De plus, l'angiotensine II exerce différents effets non-hémodynamiques sur le rein, comme l'apoptose, la protéinurie, l'inhibition de la synthèse de NO, la stimulation de la synthèse du collagène et des effets sur la croissance (prolifération, hypertrophie). La plupart de ces effets ont été démontrés dans des modèles cellulaires ou animaux. La corrélation chez les humains reste à démontrer (WOLF 2003a).

2.2.5 Les récepteurs de l'angiotensine

Les actions de l'angiotensine II résultent de sa liaison à des récepteurs spécifiques. Les deux principaux, chez l'humain, sont AT1 et AT2. Ils sont tous deux de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, mais les voies de signalisation déclenchées par chacun sont très différentes et même parfois opposées. Par exemple, l'activation du récepteur AT1 induit des réponses qui stimulent la vasoconstriction alors, que l'activation du récepteur AT2 stimule la vasodilatation. Ces deux types de récepteurs sont abondamment distribués et ce de façon tissu spécifique. Ils sont tous deux présents dans le rein, le cerveau et la glande surrénale. Par contre, dans les tissus cardiovasculaires, c'est le récepteurs AT1 qui est présent chez l'adulte, tandis

que le récepteur AT2 est plus abondant lors du développement du fœtus (LAVOIE 2003). Les récepteurs AT1 sont également exprimés dans les vaisseaux et le foie. La distribution du récepteur AT2 se limite à la médulla adrénale, l'utérus, les ovaires, l'endothélium vasculaire et des régions distinctes du cerveau chez l'adulte sain (PERAZELLA 2003).

Les deux ont été clonés et sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Cependant, ils possèdent seulement 30% d'homologie au niveau de leurs séquences (WOLF 2003a). Les récepteurs AT1 sont couplés avec les protéines G hétérotrimériques et activent différentes voies de signalisation, dont, entre autre, l'activation des phospholipases, l'inhibition des cyclases, la stimulation de la phosphorylation des tyrosines et d'autres seconds messagers (BERNSTEIN 2001). L'activation des récepteurs AT2 mène à une augmentation de l'activité phosphatase intracellulaire, et leur association avec les protéines G demeurent incertaine (GALLINAT 2000), mais possible (LAVOIE 2003). L'expression des récepteurs AT1 dans les reins est induite par une variété de stimuli, dont l'hypercholestérolémie et les changements dans l'osmolalité, par contre elle est diminuée en présence d'une concentration élevée d'angiotensine II (BADER 2001). Par contre, les récepteurs AT2 ne subissent pas de régulation négative en présence d'angiotensine II, mais sont induits lors de lésions tissulaires (GALLINAT 2000). Donc l'angiotensine II peut se lier de façon préférentielle au récepteur AT2 dans des situations pathophysiologiques avec un système rénine-angiotensine activé localement suite à une lésion tissulaire (WOLF 2003a). Chez les rongeurs, les récepteurs AT1 sont de deux sous-types : AT-1a et AT-1b. Ils sont pharmacologiquement indistinguables, mais sont les produits de deux gènes différents (*Agtr1a* et *Agtr1b*) (BURSON 1994). Il existe également d'autres formes de récepteurs (entre autre AT3, AT4 et MAS) qui sont moins bien connues (LAVOIE 2003).

2.2.6 Les systèmes rénine-angiotensine locaux

Les systèmes rénine-angiotensine locaux, qui ont la capacité de produire de façon locale de l'angiotensine II, existent dans les tissus qui subissent l'action de l'angiotensine II. Le concept de système rénine-angiotensine localisé au niveau des tissus est soutenu par des études qui prouvent l'expression de toutes les composantes du système rénine-angiotensine au niveau de ces tissus. En effet, toutes les composantes d'un système rénine-angiotensine fonctionnel se retrouvent, entre autre, dans le cerveau, le cœur, les vaisseaux, les tissus adipeux, les gonades, le pancréas, le placenta et les reins. Ce sont les observations cliniques qui donnent de l'importance aux systèmes rénine-angiotensine locaux. En effet, l'action antihypertenseur des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine concorde plus avec l'inhibition d'une enzyme de conversion de l'angiotensine locale qu'avec l'inhibition de l'enzyme plasmatique. De plus, les patients avec un niveau bas d'activité du système rénine-angiotensine systémique peuvent être traités de façon efficace par des inhibiteurs du système rénine-angiotensine. Il est présumé que le système rénine-angiotensine intrarénal régule la pression sanguine systémique et les aspects de la fonction rénale comme la réabsorption du sodium (LAVOIE 2003).

Dans certains tissus ce ne sont pas toutes les composantes du système rénine-angiotensine qui sont présentes. Cela a mené à la supposition qu'il existe des moyens alternatifs de produire l'angiotensine II. Il a déjà été rapporté qu'il est possible de transformer l'angiotensine I en angiotensine II sans passer par l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cela est possible grâce à l'action d'autres enzymes comme la cathepsine G, l'enzyme génératrice d'angiotensine II sensible au chymostatin (CAGE de l'anglais *Chymostatin-sensitive Angiotensin II-Generating Enzyme*) et la chymase (LIAO 1995, URATA 1993). Il existe également des voies indépendantes de la rénine qui passent par la cathepsine G, la tonine ou l'activateur tissulaire du plasminogène (*t*-PA de l'anglais *Tissue-Plasminogen Activator*) (figure 2.3). La fonction physiologique des ces voies alternatives n'est pas encore claire (LAVOIE 2003). Ces voies alternatives sont activées

principalement dans l'endothélium vasculaire par divers stimuli dont un étirement mécanique et une lésion physique (PERAZELLA 2003).

L'angiotensinogène, qui fait parti du système rénine-angiotensine local du rein, est exprimé dans les cellules de tubules proximaux et est sécrété de façon polarisée à travers la membrane apicale dans la lumière du tubule. Dans la lumière, la rénine, qu'elle ait été filtrée de la circulation, transportée des interstices rénaux ou produite dans les tubules, transforme l'angiotensinogène en angiotensine I (PERAZELLA 2003). L'angiotensine I est alors rapidement convertie en angiotensine II par le haut niveau d'enzyme de conversion de l'angiotensine qui est présent à la membrane des tubules proximaux (LAVOIE 2003). Des expériences de microponction et de microdialyse ont démontrées que les tubules proximaux et le liquide interstitiel contiennent des concentrations d'angiotensine II dans l'ordre du nanomolaire, alors que dans la circulation systémique cette concentration n'est que de l'ordre du picomolaire (SEIKALY 1990, NISHIYAMA 2002). Cela confirme que les cellules du tubule possèdent leur propre système rénine-angiotensine et produisent de l'angiotensine II (van KATS 2001).

2.3 La néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique sert de dénomination à l'ensemble des manifestations rénales (au niveau de la structure et de la fonction) des maladies vasculaires chez les personnes souffrant du diabète (MARTINS 2001). En 2000, la néphropathie diabétique était présente chez le tiers des patients souffrant du diabète et cela représentait près de la moitié des nouveaux cas de maladie rénale de phase terminale (MARTINS 2001). Ce qui en fait la première cause de maladie rénale de phase terminale au monde (HARRIS 1998). La progression des maladies rénales due au diabète est causée par la concentration sanguine élevée en glucose, l'hypertension et une activation inappropriée du système rénine-angiotensine. En effet, des études cliniques ont déjà démontré l'importance d'un bon contrôle de la glycémie

(BAKRIS 2000), de la réduction de la pression sanguine (MOGENSEN 1991, OLIVARIUS 1993) et du blocage du système rénine-angiotensine (RAVID 1998, COWIE 1989,) dans le ralentissement de la progression des néphropathies diabétiques. Malgré toutes ces améliorations, l'incidence des maladies rénales de phase terminale ne cesse d'augmenter aux États-Unis et partout dans le monde où le diabète est un problème majeur (KELLY 2003). D'autres facteurs de risque sont liés à la néphropathie diabétique comme l'âge avancé, le sexe masculin, être ménopausé, être de race afro-américaine ou amérindienne, être fumeur, la résistance à l'insuline, la grande consommation de protéines dans la diète, l'hypercholestérolémie et un niveau élevé d'hémoglobine glycosylée (OLIVARIUS 1993, RAVID 1998, COWIE 1989).

2.3.1 Les traitements

Pour les patients aux premiers stades de développement de la néphropathie diabétique, les traitements présentement employés sont un contrôle sévère de la glycémie, de la pression sanguine et du niveau de lipides présents dans le sérum, l'interdiction de fumer et dans certains cas la réduction de la prise alimentaire de protéines. Ces mesures réduisent l'incidence de la maladie rénale chez les patients qui sont dans les premiers stades de la néphropathie diabétique et retardent la progression de la maladie rénale chez les patients qui ont une néphropathie bien établie. Chez ces derniers, la modification des facteurs de risques s'accompagne d'une prise de médicaments pour ralentir la progression de la maladie. Parmi les médicaments présentement utilisés, il y a les antihypertenseur comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine, les β bloqueurs, les bloqueurs des canaux calciques, les α bloqueurs, les diurétiques et les vasodilatateurs, ou une combinaison de ces traitements (MARTINS 2001).

2.3.2 Les mécanismes de son évolution

Le déclin de la fonction rénale associé à la néphropathie diabétique et la dialyse qui s'en suit sont inévitables et surviennent dans les années ou même les mois qui suivent le diagnostique (MANNS 2000). Les mécanismes qui mènent à la progression des maladies rénales sont présentement très étudiés. Ils incluent les changements hémodynamiques au niveau du rein, le degré de protéinurie qui cause les défauts aux tubulointerstices, les mécanismes d'adaptation de croissance des reins, comme l'hypertrophie compensatoire des néphrons survivants, l'infiltration du parenchyme rénal par des cellules inflammatoire, le relâchement local de facteurs profibrogéniques, l'activation de la coagulation intrarénale, l'hypoxie et les changements dans les niveaux de lipides et de glycoprotéines dans le sérum (KLAHR 1998).

La pathogenèse des lésions structurales multiples lors d'une néphropathie diabétique demeure en débat et est probablement multifactorielle. L'épaississement uniforme des membranes basales du rein sur lesquelles reposent les éléments des glomérules et des tubules semble être une conséquence des perturbations métaboliques directement reliées à l'hyperglycémie. La plupart des études ont mis l'emphasis sur l'accumulation de matrice extracellulaire dans les membranes basales des glomérules et dans le mésangium et sa relation avec le dérèglement de la fonction glomérulaire. Peu est connu sur la pathogenèse et la signification des changements au niveau des tubulointerstices et de l'épaississement de la membrane basale des tubules. Il est possible que ces changements soient liés à l'hypertrophie cellulaire de l'épithélium des tubules rénaux, qui double la membrane basale des tubules. Il a été postulé que dans les premiers stades de la maladie, l'hyperglycémie induit l'hypertrophie des tubules rénaux et stimule la synthèse de plusieurs composantes de la matrice qui constituent la membrane basale des tubules. Ensuite, la composition de la matrice est susceptible d'être modifiée par une glycolysation non-enzymatique, processus induit une résistance à sa dégradation. Des expériences *in vitro* sur des

cellules de tubules proximaux murins ont amené des évidences qu'une concentration élevée en glucose est un stimulus suffisant pour l'hypertrophie cellulaire et la production de collagène de type IV (le constituant majeur de la membrane basale des tubules). En effet, une concentration élevée en glucose augmente la stabilité de l'ARNm du collagène IV du à l'activation transcriptionnelle d'éléments situés en *cis* du gène et qui sont contrôlés par une présumée protéine de réponse au glucose (ZIYADEH 1993).

Les altérations hémodynamiques sont également importantes dans la progression de la néphropathie diabétique. L'augmentation du taux de filtration dans le glomérule est due largement à l'augmentation du débit du plasma et de la pression dans les capillaires du glomérule. En outre, l'élévation de la pression dans les capillaires peut endommager les cellules endothéliales, épithéliales et mésangiales du glomérule et de ce fait initier et contribuer à la progression de la néphropathie diabétique (O'BRYAN 1997). Les cellules épithéliales des tubules proximaux sont des acteurs important dans l'orchestration des événements dans l'interstice cortical lors d'une néphropathie diabétique. Elles jouent un rôle plus particulièrement dans la régénérescence de la matrice extra cellulaire, la génération de cytokines et le recrutement de cellules inflammatoires. De plus, elles sont la source de myofibroblastes dans l'interstice, qui sont les médiateurs principaux du processus qui mène à la fibrose (PHILLIPS 2003).

La manifestation clinique de la néphropathie diabétique naissante est une microalbuminurie persistante qui se transforme en protéinurie à mesure que la néphropathie diabétique se confirme. Plus tard, il y a un déclin progressif dans le taux de filtration glomérulaire finissant, dans un délai de 5 ans, par une maladie rénale de phase terminale chez 50% des patients (HASSLACHER 1989). La pathologie des lésions rénales sont semblable dans le diabète de type I et II (TAFT 1994), bien qu'on l'ait suggéré qu'il y ait plus d'hétérogénéité pour le diabète de type II (CHIHARA 1986). Les études analysant les rapports entre la structure et la

fonction ont démontré que le développement de la protéinurie est en corrélation avec le degré d'expansion mésangiale (WHITE 2000). Bien que la néphropathie diabétique ait été traditionnellement considérée comme une maladie principalement glomérulaire, on accepte maintenant largement que le taux de détérioration de la fonction rénale est lié avec le degré de fibrose tubulointerstitielle rénale (BOHLE 1991, NANGAKU 2004). Ceci suggère que bien que pour la majorité de patients l'événement primaire se manifeste par des changements glomérulaires ayant pour résultat la protéinurie, les résultats à long terme sont déterminés par des événements dans l'interstice rénal. L'intérêt de plusieurs recherches c'est donc concentré sur le rôle des cellules, telles que les cellules épithéliales du tubule proximal ou les myofibroblastes interstitiels, dans le déclenchement de la fibrose. Les cellules épithéliales du tubule proximal orchestrent la fibrose interstitielle rénale lors d'une néphropathie diabétique en raison des changements dépendants du glucose dans leur fonction (PHILLIPS 2002). La protéinurie est le mécanisme principal qui induit les dommages tubulointerstitiels qui mènent à la défaillance rénale. La filtration de macromolécules par les cellules du tubule cause divers effets directs comme la rupture des lysosomes, l'épuisement de l'énergie des cellules et des dommages tubulaires directement induits par des éléments comme les composants du complément. De plus, la fibrose interstitielle altère la diffusion et l'approvisionnement en oxygène des tubules et les dommages tubulointerstitiels détruisent des capillaires peritubulaires altérant le flux sanguin. Ces deux phénomènes entraînent une hypoxie chronique qui mène à la destruction de cet espace (NANGAKU 2004).

PKC β est l'isoforme majeur qui est activé par l'hyperglycémie dans les reins diabétiques (CRAVEN 1989). De plus, l'inhibition de PKC β réduit l'albuminurie (ISHII 1996) et l'expansion mésangiale (KOYA 2000). Cela laisse donc croire que PKC β joue un rôle important dans le développement de la néphropathie diabétique. En effet, une étude chez des rats présentant toutes les caractéristiques de la néphropathie diabétique, incluant une hyperglycémie, de l'hypertension et une

activation du système rénine-angiotensine, a démontré que l'inhibition *in vivo* de PKC β conduit à une réduction de l'albuminurie, des dommages structuraux et de l'expression de TGF- β , malgré le fait que l'hyperglycémie et l'hypertension soient toujours présentes (KELLY 2003).

2.3.3 L'activation du système rénine-angiotensine

Il y a maintenant plusieurs évidences cliniques et expérimentales, qui suggèrent que le système rénine-angiotensine soit un joueur clé dans le mécanisme complexe de la progression de la défaillance rénale chronique (WOLF 2003a).

Le niveau d'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine semble être un facteur important dans la fonction pathophysiologique du système rénine-angiotensine. En effet, il y a une variante commune du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'allèle D, qui résulte en un niveau d'expression de l'enzyme plus élevé. Des maladies rénales sévères ont été associées à cette variante, suggérant une implication du niveau d'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (JARDINE 1998). De plus, la surexpression de trois copies du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine chez la souris mène à une néphropathie sévère lors de l'induction expérimentale du diabète (HUANG 2001).

Les causes de la néphropathie diabétique demeurent inconnues, mais il est reconnu que l'angiotensine II joue un rôle important (LEWIS 1993, INGELFINGER 1991). Le système rénine est souvent supprimé chez les patients souffrant de diabète de type 2 (CHRISTLIEB 1976, PEREZ 1977). Il a déjà été démontré qu'une thérapie avec l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine apporte des bénéfices et une protection aux reins des diabétiques, probablement via un mécanisme qui diminue la formation d'angiotensine II (INGELFINGER 1991). L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine demeure une thérapie efficace, même chez les patients ayant un niveau faible de rénine dans le plasma (ce qui laisse croire à

une diminution de l'angiotensine II), à cause de l'augmentation de l'angiotensine II intrarénale. En effet, l'augmentation intrarénale de l'angiotensine II peut supprimer l'expression de la rénine dans la circulation, et médie l'effet thérapeutique de l'interruption du système rénine dans la néphropathie diabétique. Dans cette optique, de nouvelles études cliniques ont été effectuées pour tester l'efficacité des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II pour la prévention de la néphropathie diabétique. Pour l'instant, ils offrent la même protection que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, sans amélioration notable. Mais comme ils offrent un blocage plus spécifique de ce qui semble être la cause des troubles rénaux chez les diabétique, ils semblent plus prometteurs. D'autres études sont donc nécessaires pour vérifier leur efficacité (PRICE 2001).

2.3.4 L'hypertrophie, la prolifération et l'apoptose

Après une lésion rénale de type chronique, l'accumulation locale de protéines de matrice fait partie des processus d'adaptation des néphrons survivants, ainsi qu'une croissance rénale (FLOEGE 1992, WOLF 1995b). L'effet de l'angiotensine II observé sur la croissance est différent d'un type cellulaire à l'autre dans le rein. Ces effets sont résumés dans le tableau I (adapté de WOLF 2003a).

<i>Glomérule</i>	
Cellules mésangiales	prolifération, hypertrophie
Cellules endothéliales	prolifération
<i>Tubule</i>	
Cellules de tubules proximaux	hypertrophie
Branche ascendante large de l'anse de Henlé	prolifération
<i>Interstice</i>	
Fibroblasts	prolifération

Tableau I : Les effets de l'angiotensine II selon le type de cellule rénale.
(Adapté de WOLF 2003a)

La médiation de l'hypertrophie induite par l'angiotensine II, dans les tubules proximaux, passe par les récepteurs de type AT₁. Elle demande un arrêt en phase G₁

du cycle cellulaire. La surexpression de p27^{Kip1} bloque les cellules dans la phase G₁ du cycle cellulaire, car p27^{Kip1} est un inhibiteur des kinases cycline-dépendante. Des traitements à l'angiotensine II, *in vitro* et *in vivo*, augmentent l'expression de la protéine p27^{Kip1}, mais n'augmentent pas l'expression de son ARNm (WOLF 1996, 2001). Les radicaux oxygènes et l'activation des MAPK (Erk 1/2) jouent un rôle important dans l'induction de p27^{Kip1} par l'angiotensine II (HANNKEN 1998, 2000). À l'encontre de ce qui se passe pour les tubules proximaux, l'angiotensine II stimule la prolifération des segments plus distaux du néphron, comme pour les cellules murine isolées de la branche ascendante large de l'anse de Henlé (WOLF 1995a).

L'angiotensine II est liée à la progression des maladies rénales par plusieurs mécanismes incluant l'induction de l'hypertrophie des tubules épithéliaux et la stimulation de la synthèse de matrices extra-cellulaires. Après une stimulation avec l'angiotensine II, les cellules épithéliales des tubules ont différents comportements selon leur localisation. En effet, les cellules de tubules proximaux subissent une hypertrophie, alors que les cellules de tubules distaux entrent en prolifération. L'action hypertrophique de l'angiotensine II est médiée par une liaison de haute affinité avec les récepteurs AT1 et implique l'activation de la protéine G1 et dépend de la diminution de l'AMPc intracellulaire. L'angiotensine II induit l'activation séquentielle des MAPK et de la kinase S6, ce qui mène à la modulation de l'activité d'une série de cyclines et de kinases dépendantes des cyclines. Il a également déjà été démontré que l'hypertrophie épithéliale induite par l'angiotensine II et la stimulation de la synthèse du collagène de type IV sont dues à une augmentation de la transcription et de la production de TGF- β . De plus, l'inhibition de la dégradation des protéines induites par l'angiotensine II peut contribuer à l'augmentation du contenu en protéines. En culture cellulaire, la réponse hypertrophique à l'angiotensine II est encore plus grande en présence de concentrations élevées en glucose (WOLF 1997).

Les cellules rénales sont une riche source de TGF- β et servent de cible à son action. L'action de TGF- β sur la croissance rénale et le métabolisme de matrice extracellulaire ressemble à l'action d'une concentration élevée en glucose et laisse croire que TGF- β joue un rôle dans le développement des maladies rénales liées au diabète. Les cellules de tubules proximaux et les cellules mésangiales du glomérule cultivées en présence d'une concentration élevée en glucose expriment un haut niveau de l'ARNm de TGF- β , ainsi qu'un haut niveau de protéines. Le traitement de ces cellules avec des anticorps contre le TGF- β prévient l'induction de l'hypertrophie et la stimulation de production de collagène, normalement induite par une concentration élevée en glucose. Il également été observé, chez les rats diabétiques BB et chez les souris NOD, tous deux dépendant de l'insuline, que le développement de l'hypertrophie rénale est associé à la surexpression de TGF- β dans leur rein. L'administration à court terme d'anticorps neutralisant l'action de TGF- β à des souris dont le diabète a été induit par la streptozotocine conduit à une diminution de l'hypertrophie des glomérules et du rein entier, ainsi qu'à une diminution de la surexpression des ARNm codant pour les composantes de la matrice extracellulaire. Pris ensemble, ces faits laissent croire que le diabète stimule la production de TGF- β dans le rein et que ce facteur de croissance induit à son tour les premières manifestations des maladies rénales dues au diabète et ce d'une manière paracrine et autocrine. (SHARMA 1995)

L'angiotensine II peut également induire l'apoptose de certains types cellulaires du rein, sous des conditions précises (BONNET 2001). L'apoptose dans les tubules est très importante chez les rats diabétiques Ren-2 qui surexpriment l'angiotensine II et la rénine (KELLY 2002). L'induction de l'apoptose par l'angiotensine II *in vitro* est aussi observée (BONNET 2001). Il a été suggéré que l'activation des récepteurs AT2 soit responsable de cet effet, mais cela demeure controversé (BONNET 2001, YAMADA 1996, MARIC 1998). Le fait que les cellules deviennent plutôt en hypertrophie ou en apoptose peut dépendre de la présence de facteurs de croissance

additionnels et de cytokines (WOLF 1995b). L'angiotensine II stimule la synthèse du collagène de type $\alpha 1(\text{IV})$, mais pas de type I, dans les cellules de tubules proximaux en culture (WOLF 1991). Il stimule également l'induction de TGF- β , un important médiateur profibrogénique (WOLF 1993, KAGAMI 1994). L'effet stimulateur de l'angiotensine II sur l'expression du collagène dans les tubules proximaux cultivés dépend de l'expression de TGF- β (WOLF 1998).

2.4 Les protéines kinases C

La famille des PKC est une famille d'enzyme monomérique de poids moléculaires semblable (79-82 kDa). Ce sont des protéines kinases spécifiques aux sérines et thréonines. Elles ont été identifiées lors d'études fonctionnelles grâce à des propriétés enzymatiques semblables comme la liaison aux esters de phorbol, une activité kinase dépendante des phospholipides ou encore par des propriétés structurales communes (NISHIZUKA 1984). La famille des PKC comprend actuellement 12 isoformes chez les mammifères, qui diffèrent par leurs structures et leurs propriétés enzymatiques. (DEKKER 1994)

2.4.1 Structure et activation

Les membres de la famille des PKC sont des polypeptides qui comportent une région N-terminale régulatrice ainsi qu'une région C-terminale catalytique (approximativement de 20 à 40 kDa et 45 kDa respectivement). La première isoenzyme clonée comportait quatre domaines conservés nommés C1 à C4.

Le domaine C1 contient un motif riche en cystéines qui forme le site de liaison des diacylglycérol/esters de phorbol. Ce domaine est dupliqué dans beaucoup d'isoenzymes. Il est précédé par une séquence de pseudo-substrat auto-inhibitrice. Le domaine C2 contient le site de reconnaissance pour les lipides acides et dans certains isoenzymes le site de liaison au Ca^{2+} . Les domaines C3 et C4 forment les

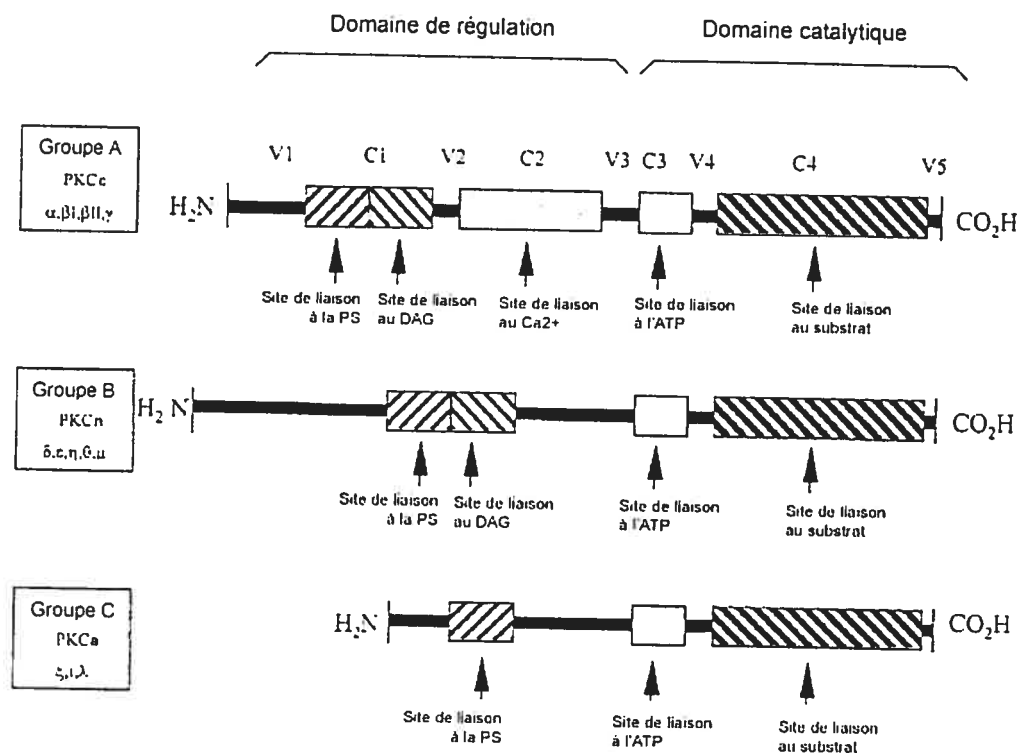


Figure 2.4 : Structure des PKC. Structures des domaines catalytiques et de régulation des PKC conventionnelles (A), nouvelles (B) et atypiques (C) et sites de liaison au calcium, à la phosphatidylsérine (PS), au diacylglycérol (DAG) et à l'ATP. C1 à C4 : domaines conservés ; V1 à V5 : domaines variables. (Adaptée de IDRIS 2001)

lobes de liaison à l'ATP et au substrat et forment le centre catalytique. Les domaines catalytiques et de régulation sont séparés par une partie charnière qui devient labile protéoliquement quand l'enzyme est liée à la membrane cellulaire. Le domaine kinase ainsi créé est constitutivement actif, car il est libéré de l'inhibition du pseudo-substrat. Cette partie porte alors le nom de protéine kinase M (NEWTON 1995).

Il y a douze isoenzymes (NISHIZUKA 1992, HUG 1993, DEKKER 1994) connues pour PKC. Elles sont classées en trois groupes selon leurs structures et leurs régulations par des cofacteurs. Il y a les PKC conventionnelles, nouvelles et

atypiques. Il existe quatre PKC conventionnelles : α , β I, β II et γ . β I et β II sont des variantes produites par épissage alternatif. La fonction de ces PKC est régulée par le Ca^{2+} , ce qui caractérise ce groupe. C'est leur domaine C2 qui remplit cette fonction. Elles sont également régulées par les phospholipides. Les PKC nouvelles sont au nombre de cinq : δ , ϵ , η , θ , et μ . Elles sont très semblables aux PKC conventionnelles au niveau de la structure, sauf qu'elles ne sont pas régulées par le Ca^{2+} . Il y a trois PKC atypiques : ζ , ι et λ . Elles sont les moins bien connues et elles sont les plus éloignées au niveau de la structure. Leur domaine C1 ne contient qu'un motif doigt de zinc riche en cystéine, au lieu de deux. De plus, elles ne répondent pas aux esters de phorbol que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (IDRIS 2001).

Il y a deux mécanismes de régulation des PKC. Premièrement, une phosphorylation aligne les résidus du site catalytique le rendant ainsi actif et cela permet une localisation cytosolique des PKC. En second lieu, la liaison du substrat active l'enzyme par le déplacement du pseudo-substrat hors du site de liaison au substrat. En effet, le pseudo-substrat devient sensible à la protéolyse lorsque l'enzyme est activée. L'activation par le diacylglycérol et par les esters de phorbol s'accompagne d'une translocation à la membrane. Ces activateurs servent d'encrages hydrophobiques pour recruter les PKC à la membrane, leur affinité pour la membrane est ainsi grandement augmentée (NEWTON 1995).

Les PKC nouvellement synthétisées sont associées à la fraction non-soluble dans le détergent de la cellule. Elles deviennent matures grâce à trois phosphorylations successives. Premièrement, il y a une transphosphorylation au site d'activation ce qui rend l'enzyme catalytiquement active. Cette phosphorylation est effectuée par une kinase putative des PKC. Cela est suivi par une auto-phosphorylation en C-terminal qui stabilise la conformation catalytiquement compétente. Une seconde auto-phosphorylation en C-terminal a lieu, ce qui relâche l'enzyme dans le cytosol. Cette forme mature de PKC, triplement phosphorylée, demeure inactive, car le pseudo-substrat occupe toujours la cavité de liaison du substrat. La présence de

diacylglycérol augmente l'affinité des PKC pour les membranes. La translocation à la membrane est médiée par la liaison du diacylglycérol au domaine C1 de la PKC ainsi que la liaison de phosphatidylserine au domaine C2. L'affinité pour les lipides acides est augmentée par la présence de Ca^{2+} pour les PKC conventionnelles et par la structuration de la surface de liaison des lipides. Pour les autres PKC cette surface doit être déjà structurée. La liaison à la membrane médie le relâchement du pseudo-substrat et l'activation maximale en résulte (NEWTON 1995).

2.4.2 Expression et activation dans le rein

Les PKC semblent jouer un rôle primordial dans le fonctionnement des reins. Elles sont impliquées dans le contrôle de l'hémodynamique rénal, ainsi que dans les mécanismes de transport. Il a été démontré, entre autre, que l'angiotensine II active les PKC dans les glomérules chez le rat. De plus, dans les tubules proximaux contournés isolés de lapin, l'activation des PKC inhibe le transport du glucose, du bicarbonate et des ions chlorure. D'autres études ont démontré que l'effet inhibiteur de la dopamine sur l'activité sodium-potassium-ATPase dans les tubules proximaux passe par l'action des PKC. Il a également été trouvé que l'hormone parathyroïdienne active les PKC dans les cellules rénales d'opossum. Dans le système du tubule collecteur, la bradykinine active la PKC dans les cellules corticales du tubule collecteur. Il a aussi été démontré que l'inhibition de PKC bloque l'effet inhibiteur de la prostaglandine E2 sur l'action de la vasopressine dans les membranes apicales des cellules du tubule collecteur de lapin. La démonstration a aussi été faite que l'activation des PKC dans les tubules collecteurs médullaires inhibe l'activité sodium-potassium-ATPase, réduisant ainsi la réabsorption de sodium (PFAFF 1999).

Il est évident que plusieurs isoformes de PKC sont exprimés dans le rein. Chez le rat les isoformes α , β , δ , ϵ , et ζ , ont été localisés dans le cortex rénal (LaPORTA 1993). Il a également été démontré par un essai pour l'activité de PKC et par un *Western*

que les isoformes α , δ , ϵ , ζ , λ et ι de PKC sont exprimés dans les reins de rats et d'humain (ERDBRUGGER 1997).

PKC α semble être l'isoenzyme prédominante dans le rein (ERDBRUGGER 1997, DONG 1991). Les trois isoformes (α , β I, β II) sont exprimés dans le cortex et dans la medulla tel que déterminé par un *Western*. L'expression spécifique des isoenzymes a été déterminée par immunohistochimie. Les tubules proximaux qui sont séparés en trois segments montrent la distribution suivante : le segment S1 ne contient aucune des trois isoenzymes, le segment S2, ainsi que le segment S3, réagissent positivement avec les anticorps pour les isoenzymes α et β I. Aucun des segments ne réagit avec l'anticorps spécifique pour la PKC β II (PFAFF 1999).

L'hyperglycémie intracellulaire augmente la quantité de diacylglycérol présent dans les glomérules rénaux des animaux diabétiques, principalement par une synthèse *de novo* (KOYA 1998). L'augmentation de cette synthèse *de novo* active la PKC dans les cellules vasculaires cultivées (XIA 1994), dans la rétine et les glomérules d'animaux diabétiques (KOYA 1998). Ce sont principalement les isoformes β (dans le rein) et δ de la PKC qui sont activés en premier, mais l'augmentation d'autres isoformes est aussi présente, comme l'activation de PKC α et ϵ dans la rétine (KOYA 1998). L'hyperglycémie peut également activer différents isoformes de PKC indirectement en augmentant les espèces réactives de l'oxygène (BROWNLEE 2001). Il a été démontré que l'activation de PKC β dans le diabète expérimental précoce entraîne des anomalies au niveau de la rétine et du flux sanguin, probablement en diminuant la production d'oxyde nitrique ou en augmentant l'activité de l'endotheline-1 (ISHII 1996).

2.4.3 Rôle dans la néphropathie diabétique

Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré l'activation de la voie de signalisation PKC- MAPK dans le glomérule isolé d'animaux diabétiques et dans les cellules

mésangiales exposées à une concentration élevée en glucose. PKC β est l'isoforme qui est activé de façon préférentielle dans le glomérule des souris diabétique db/db et un inhibiteur spécifique des PKC β administrés oralement inhibe l'activation des PKC dans les glomérules et améliore l'excrétion de l'albumine dans l'urine et certains états pathologique du rein comme l'expansion mésangiale possiblement via l'atténuation de l'expression glomérulaire de TGF- β et l'accumulation de matrice extra cellulaire (KIKKAWA 2003, HANEDA 2001).

Dans une autre étude, l'utilisation d'un inhibiteur des PKC β a permis de normaliser l'hyperfiltration glomérulaire, de diminuer l'excrétion d'albumine et de réduire la production dans le glomérule de TGF- β et des protéines de la matrice extra-cellulaire dans plusieurs modèles animaux (rats et rats Ren-2 qui ont un diabète induit par la streptozotocine, et souris db/db). Ceci améliore la glomérulosclérose, la fibrose tubulointerstitielle et la fonction rénale (TUTTLE 2003). Plusieurs études ont démontré que la PKC β et le système rénine-angiotensine sont interreliés dans le rein. La PKC β peut être stimulé par l'angiotensine II dans le néphron proximal et les inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peuvent réduire l'augmentation causé par le diabète de l'expression des PKC β dans le glomérule (OSICKA 2001). L'inhibition de PKC β chez le rat abolit l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II sur l'artériole efférente du glomérule, ce qui suggère un lien entre l'angiotensine II et l'hyperactivité de PKC β (NAGAHAMA 2000).

Une expérience avec des souris PKC α (-/-) a démontré que l'hypertrophie glomérulaire était semblable dans ces souris et celles de type sauvage lorsque qu'un diabète est induit à l'aide de la streptozotocine. Par contre ces souris ne développent pratiquement pas d'albuminurie. Ces deux dérèglements sont donc régulés de façon différente. L'albuminurie induite par le glucose semble être médiée par PKC α via la diminution de la production des protéoglycans dans la membrane basale et la régulation de l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire. Alors

que l'hypertrophie glomérulaire peut être médié par l'expression de TGF- β 1 puisque que son expression n'est pas modifiée par le manque de production de PKC α (MENNE2004).

2.5 L'élément de réponse à l'insuline et les IRE-BP

Il existe une séquence d'ADN qui est présente en amont de différents gènes qui est appelée l'élément de réponse à l'insuline. Il médie l'action de l'insuline sur ces gènes. Cette séquence est entre autre présente en amont des gènes du glucagon (PHILIPPE 1991), de l'apolipoprotéine AI (MURAO 1998) et de l'angiotensinogène (CHAN 1990) chez le rat. L'élément de réponse à l'insuline de l'angiotensinogène de rat est homologue à différents degrés avec celui des autres gènes. Il va des nucléotides -882 à -855 et contient le motif caractéristique des éléments de réponse à l'insuline des nucléotides -878 à -864. Ce motif est le suivant 5' CC TTC CCG CCC TTC A 3'. Il présente 60% d'homologie avec celui de l'apolipoprotéine AI et 53% avec celui du glucagon (CHEN 2001).

Lorsque les IRPTC sont cultivées en présence d'une concentration élevée en glucose l'expression de l'ARNm l'angiotensinogène est augmentée, ainsi que sa sécrétion. Cet effet stimulateur est contré par l'addition d'insuline dans le milieu de culture (ZANG 1999a). L'action de l'insuline sur l'expression de l'angiotensinogène passe par l'élément de réponse à l'insuline. En effet, des études de mutagenèse dirigée ont démontrées que ce motif est essentiel pour l'action de l'insuline (CHEN 2001). De plus, il est observé, chez les IRPTC, une liaison de l'élément de réponse à l'insuline à une ou des protéines nucléaires. En effet, le motif de l'élément de réponse à l'insuline de l'angiotensinogène de rat marqué radioactivement se lie a une protéine majeure de 48 kDa lors d'un *Southwestern*. De plus, lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration élevée en glucose, l'expression de cette protéine de 48 kDa est augmentée et l'expression d'une autre protéine de 70 kDa est induite. L'adition d'insuline annule ces actions. Ces protéines ont été nommées

protéines de liaison à l'élément de réponse à l'insuline (IRE-BP de l'anglais *Insulin-Responsive Element-Binding Proteins*). Comme rien n'est encore connu sur la structure, ni réellement sur la fonction, des IRE-BP il est possible que ce soit des protéines déjà connues ou alors de toutes nouvelles protéines (CHEN 2001).

2.6 Les IRPTC

Plusieurs modèles de culture cellulaire ont été élaborés afin d'étudier les reins. En cultivant un seul type de cellule à la fois, il est possible de bien définir l'expression et l'action de chaque protéine dans un type cellulaire donné. La culture cellulaire permet d'expérimenter différentes conditions qui peuvent être difficile à obtenir *in vivo*. En effet, il est possible de mettre les cellules en présence de substances exogènes et de vérifier leurs réactions à cette stimulation. Il existe une lignée cellulaire de tubules proximaux de rat immortalisées (IRPTC de l'anglais *Immortalized Rat Proximal Tubular Cells*). Comme c'est une lignée cellulaire immortalisée, elle est beaucoup plus facile à maintenir en culture qu'une lignée primaire et son comportement est très semblable à celui des tubules proximaux *ex vivo*. Cette lignée cellulaire est hautement différenciée et exprime différents marqueurs des tubules proximaux de rats. Ces marqueurs sont, entre autre, l'anhydrase carbonique, le GLUT-2, la phosphatase alcaline, l'aquaporine-1 et la mégaline. Les IRPTC expriment également les composantes du système rénine-angiotensine soit l'angiotensinogène, la rénine, l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène et les récepteurs de l'angiotensine II (INGELFINGER 1999). De plus, la production d'angiotensinogène par les IRPTC répond à une augmentation de la concentration de glucose ou d'insuline comme les cellules en culture primaire de tubules proximaux de rat non diabétique, ce qui démontre que c'est un bon modèle d'étude. En utilisant cette lignée cellulaire il a été démontré que l'insuline inhibe l'expression de l'angiotensinogène via l'activation des MAPK (ZHANG 1999a). La culture des IRPTC dans un milieu contenant une concentration élevée en glucose augmente les niveaux intracellulaires de sorbitol, de fructose, de diacylglycérol,

l'activité des PKC, ainsi que l'expression de l'angiotensinogène. L'ajout d'inhibiteurs des PKC inhibe l'effet stimulateur d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène et l'ajout d'un stimulateur des PKC augmente cet effet de stimulation. Donc, l'effet de stimulation d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène passe, au moins en partie, par la synthèse *de novo* de diacylglycérol, qui est un activateur de la voie de signalisation des PKC (ZHANG 1999b).

3. Hypothèse et buts

Il est présumé que l'expression de la PKC β 1 joue un rôle important dans les modifications liées à la néphropathie diabétique et que les effets de l'hyperglycémie sur les IRPTC sont induits par la PKC β 1. Entre autre, au niveau de l'expression de l'angiotensinogène et de l'hypertrophie chez les IRPTC.

Les buts de cette étude sont d'étudier les implications de la PKC β 1 sur l'expression de l'angiotensinogène et l'hypertrophie des IRPTC en condition d'hyperglycémie en utilisant un dominant négatif.

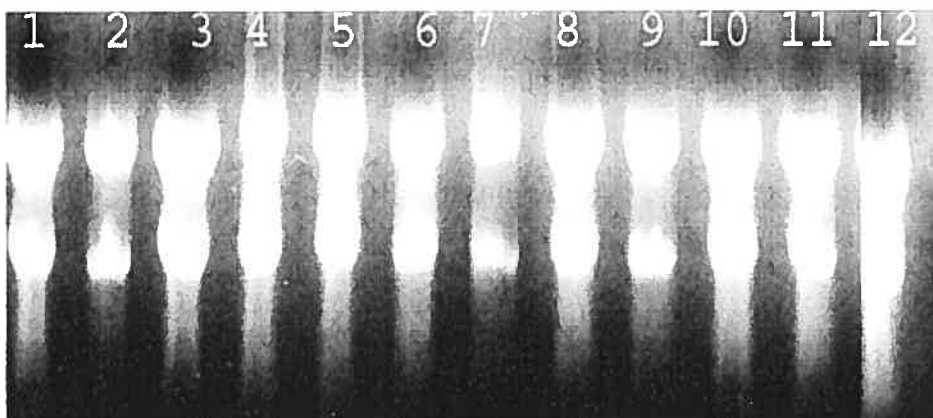
4. Méthodes et résultats

4.1 Établissement de la lignée cellulaire DN-PKC β 1 dans les IRPTC

Pour étudier l'impact de la PKC β 1 dans les cellules IRPTC, elles ont été transformées avec un plasmide qui exprime un dominant négatif de cette protéine (DN-PKC β 1). Ce plasmide est le plasmide pTB701 qui contient l'ADNc de PKC β 1 qui a été muté. En effet, la lysine 371 a été transformée en méthionine par mutagenèse dirigée (KURODA 1996), ce qui détruit le site de liaison à l'ATP du domaine catalytique. De plus, la protéine DN-PKC β 1 est munie d'une étiquette (*tag*) qui correspond aux acides aminés 98 à 106 (YPYDVDPYA) de l'hémagglutinine du virus de l'influenza humain (HA) en N-terminal pour faciliter la détection des protéines mutantes (BANDYOPADHYAY 1999). Ce plasmide a été transfecté dans les IRPTC à l'aide de la lipofectamine selon les indications du fabricant (Invitrogen). Brièvement, 2 μ g de l'ADN plasmidique a été incubé avec la lipofectamine pour 30 minutes. Le mélange a été ensuite dilué dans le milieu *OPTI-MEM* (Invitrogen) et a été déposé sur les cellules qui ont été incubé à 37 °C pendant 48 h. Puis, une dilution limite a été effectuée pour obtenir des clones uniques. C'est-à-dire que les cellules ont été comptées puis diluées de façon à obtenir une seule cellule par puits lors du transfert dans une plaque de 96 puits. Les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention de colonies (environ une semaine). Vingt-quatre puits comportant une seule colonie ont été sélectionnés. Pour maintenir la sélection, les cellules ont été cultivées dans le milieu *DMEM* (Invitrogen) additionné de 500 μ g/ml de Généticine (Invitrogen). Par la suite, les lignées cellulaires ont été maintenues dans le milieu *DMEM* additionné de 250 μ g/ml de Généticine. Le plasmide pcDNA3.1 a également été transfecté afin de servir de contrôle. Ensuite, l'ARN a été extrait des cellules à l'aide du *TRIzol* (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. Ensuite, cet ARN a été utilisé pour effectuer une analyse de *Northern* (figure 4.1). L'ARN a été séparé sur un gel d'agarose (1 %) avec du formaldéhyde.

L'ARN a ensuite été transféré par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (*Hybond N+* d'Amersham) à l'aide d'une solution saline au citrate de sodium 20 x (SSC). L'ARN a ensuite été fixé à la membrane en l'exposant aux rayons ultra-violet pour 10 minutes. La membrane a ensuite été pré-hybridée avec le tampon *QuickHyb* (Stratagene) pendant 20 minutes à 68 °C. Puis la sonde radioactive est ajoutée pour 2 h d'hybridation à 68 °C. C'est le plasmide DN-PKC β 1 coupé par l'enzyme de restriction *EcoRI* (coupe à l'intérieur de la séquence codante de DN-PKC β 1) qui a été utilisé comme sonde radioactive. La membrane a été lavée 2 fois 15 minutes à température de la pièce (2 x SSC et 0,1 % SDS) et 30 minute à 55 °C (0,5 x SSC et 0,1 % SDS).

(A)



(B)

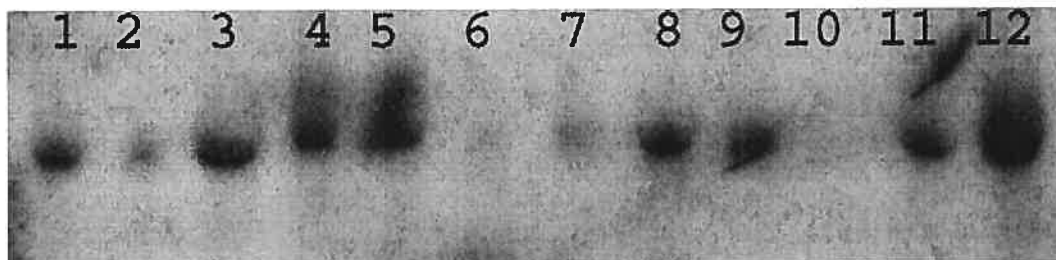


Figure 4.1 : Northern pour la sélection des clones DN-PKC β 1. Les puits de 1 à 12 correspondent respectivement aux clones 13 à 24. (A) Gel d'ARN coloré au bromure d'éthidium. (B) Northern effectué à l'aide de la sonde DN-PKC β 1 radioactive.

Plusieurs clones positifs ont été obtenus. Les clones positifs suivant ont été sélectionnés pour la suite de l'étude : 17, 20 et 24 (ils correspondent respectivement aux puits 5, 8 et 12 de la figure 4.1 B). Ces clones ont été choisis parce qu'ils expriment l'ARNm de DN-PKC β 1 à un bon niveau. Le *Northern* a été répété pour ces clones avec des contrôles afin de bien vérifier qu'ils expriment l'ARNm du DN-PKC β 1 de façon spécifique.

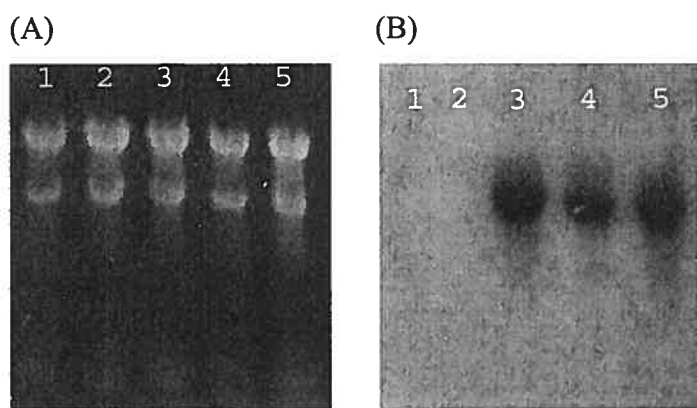


Figure 4.2 : *Northern* pour la sélection des clones DN-PKC β 1. Les puits de 1 à 5 correspondent respectivement à l'ARN des IRPTC, du contrôle (pcDNA3.1) et des clones DN-PKC β 1 17, 20 et 24. (A) Gel d'ARN coloré au bromure d'éthidium. (B) *Northern* effectué à l'aide de la sonde DN-PKC β 1 radioactive.

Il est clair, suite à ce *Northern*, que les contrôles n'expriment pas l'ARNm du DN-PKC β 1 (figure 4.2 B puits 1 et 2) et que les clones sélectionnés sont positifs (figure 4.2 B puits 3 à 5). Par contre, l'expression de l'ARNm n'implique pas automatiquement l'expression de la protéine. En effet, l'ARNm ainsi produit peut être mal interprété par la cellule hôte qui est alors incapable de le traduire en protéine. D'autres tests ont donc été effectués afin de vérifier que ces clones sont positifs et qu'ils expriment les protéines DN-PKC β 1. Premièrement, une immunoprécipitation a été effectuée à l'aide de l'anticorps contre l'étiquette HA. Les cellules ont été lysées et le lysat total (1 mg de protéines) a été incubé avec des billes d'agarose couplées à des protéines A (Bio-Rad) et l'anticorps dirigé contre l'étiquette HA (Sigma) pour toute la nuit à 4 °C. Après trois lavages avec le tampon

de lyse, les billes ont été suspendues dans un tampon de chargement 1x pour *Western*, puis chauffées 5 minutes à 95 °C. Après une centrifugation rapide, le surnageant a été appliqué sur un gel SDS-Page. Le *Western* qui a suivi l'immunoprécipitation a également été effectué à l'aide de l'anticorps dirigé contre HA. Après la migration sur gel, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) hydrophobe (*Hybond P* d'Amersham). Ensuite, la membrane a été bloquée dans une solution de saline tamponnée au tris contenant 0,1 % de Tween-20 (TBS-T) additionnée de 5% de lait écrémé en poudre pour 1 h. Puis l'anticorps dirigé contre l'étiquette HA a été ajouté et l'incubation a été poursuivie pour toute la nuit. Le lendemain, après trois lavages de 10 minutes au TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dans une solution de TBS-T additionnée de 5% de lait écrémé en poudre pour 1 h. Cet anticorps est dirigé contre l'anticorps primaire. Le complexe ainsi formé peut être visualisé grâce au substrat chimiluminescent de la peroxydase. Le substrat utilisé est le *Lumi-light* de Roche.



Figure 4.3 : Immunoprécipitation pour la confirmation des clones DN-PKC β 1. Les puits de 1 à 5 correspondent respectivement aux protéines des IRPTC, du contrôle (pcDNA3.1) et des clones DN-PKC β 1 17, 20 et 24. Immunoprécipitation de 1 mg de protéines totales.

Ainsi seule les protéines avec l'étiquette HA se retrouvent sur le gel et peuvent être détectées (figure 4.3 puits 3 à 5). Elles correspondent aux clones positifs du DN-PKC β 1. Cette expérience démontre que les protéines sont exprimées dans ces cellules. Comme l'immunoprécipitation concentre les protéines d'intérêts, une faible quantité peut être détectée par cette méthode. Il est donc approprié d'effectuer des tests complémentaires afin d'évaluer si le niveau d'expression des protéines DN-

PKC β 1 est suffisant. En effet, les protéines mutantes doivent être exprimées en grand nombre pour que leurs actions remplacent celle des protéines de la cellule. Donc, pour vérifier la quantité de protéines retrouvée dans chaque lignée, une simple analyse de *Western* a été effectuée, comme celle effectuée suite à l'immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette HA.

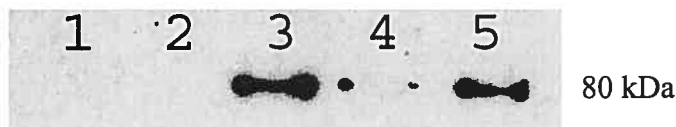


Figure 4.4 : *Western* pour la confirmation des clones DN-PKC β 1. Les puits de 1 à 5 correspondent respectivement aux protéines des IRPTC, du contrôle (pcDNA3.1) et des clones DN-PKC β 1 17, 20 et 24. Vingt microgrammes de protéines totales par puits.

Une bande de protéines est visible pour chacun des clones tandis qu'il n'y en a pas pour les contrôles. Donc ces clones expriment bel et bien les protéines DN-PKC β 1. Ce qui signifie que ces protéines inactives vont prendre la place des protéines PKC β 1 dans les cellules et bloquer leur action. Ces clones peuvent donc être utilisés pour étudier l'action de la PKC β 1 dans les IRPTC. Comme observé dans le puits numéro 4 (figure 4.4), le DN-PKC β 20 n'exprime pas la protéine DN-PKC β 1 à un niveau très élevé. Il va tout de même être utilisé pour la suite de l'étude tout en sachant qu'il n'exprime peut-être pas suffisamment de protéine pour bloquer complètement l'action de PKC β 1.

4.2 Effet du glucose et de DN-PKC β 1 sur l'expression de l'angiotensinogène

L'expression de l'angiotensinogène dans les IRPTC est influencée par la concentration de glucose présent dans le milieu de culture. En effet, lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu riche en glucose (25 mM), l'expression de l'angiotensinogène est augmentée comparativement à une culture dans un milieu comportant une concentration normale en glucose (5 mM) (ZHANG 1999 et 2000). Cette augmentation semble médiée, au moins en parti, par les protéines de la famille des PKC, puisque l'addition de GF 109203X (un inhibiteur des PKC) contre cette augmentation (ZHANG 1999 et 2000). Donc, l'étude de l'expression de l'angiotensinogène dans les clones DN-PKC β 1 est intéressante. En effet, elle va permettre de déterminer si c'est par l'isoforme β 1 que passe l'augmentation de l'angiotensinogène en condition d'hyperglycémie. L'expression de l'angiotensinogène est obtenue par RT-PCR (ZHANG 2002) suivit d'une analyse de *Southern* (HSIEH 2002). Rapidement, l'ARN total est extrait à l'aide du *TRIzol*. Deux microgrammes d'ARN total ont été utilisés pour effectuer la RT-PCR. La production de l'ADNc a été effectuée à l'aide du système de pré-amplification *Super-Script* d'Invitrogen. Puis, cet ADNc a été dilué à un ratio de 1:4 avec de l'eau. Il a ensuite servi de matrice pour une amplification par PCR des gènes de l'angiotensinogène de rat et de la β -actine (comme contrôle interne). La liste des oligonucléotides utilisés pour la PCR est disponible à l'annexe 1. Ensuite, pour identifier les produits de la PCR, une analyse de *Southern* a été effectuée à l'aide d'une sonde marquée à la digoxigénine (DIG). Brièvement, la séparation des produits de la PCR a été faite par un gel d'agarose 1,2 %. Puis le gel a été lavé dans une solution de 0,2 N de HCl pour 10 minutes, dénaturé pour 20 minutes (1,5 M NaCl et 0,5 M NaOH) et finalement neutralisé pour 20 minutes (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-Cl pH 7,2 et 0,001M EDTA). Ensuite, les produits de la PCR ont été transférés du gel vers une membrane (*Hybond N+* d'Amersham) par capillarité à l'aide de SSC 20 x pendant la nuit. La membrane a, par la suite, été séchée à

température de la pièce et exposé aux rayons ultra-violets. La membrane a été conditionnée à 42 °C pour 1 h dans le tampon *Rapid-Hyb* (Amersham). Après les sondes marquées à la DIG (à l'aide du *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit* de Roche) ont été ajoutées au tampon et les membranes ont été hybridées pendant 16 h. La membrane a été lavée 15 minutes à température de la pièce et deux fois 10 minutes à 65 °C (2 x SSC et 0,1 % SDS). Ensuite, la détection a été effectuée à l'aide de l'ensemble de détection (*DIG Luminescent Detection Kit* de Roche), selon la méthode décrite par le fabricant. Les bandes ainsi obtenues ont été quantifiées à l'aide du programme *ImageQuant TL* d'Amersham. Le ratio angiotensinogène/ β -actine a été effectué afin de normaliser la quantité d'échantillon de départ pour chaque échantillon.

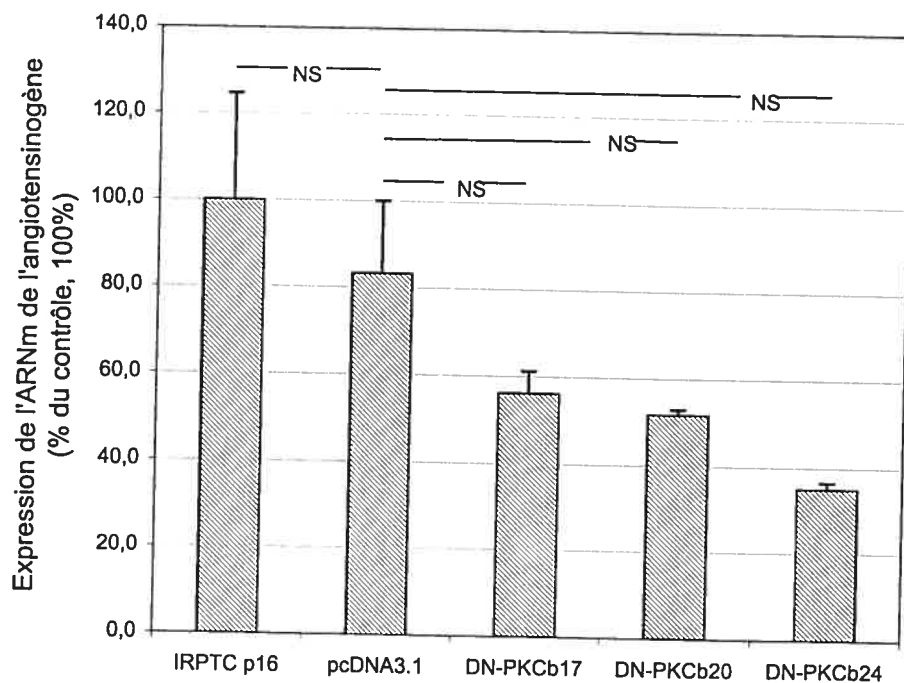


Figure 4.5: Expression de base de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les différents clones d'IRPTC déterminée par RT-PCR. La protéine β -actine sert de contrôle interne. (Chaque colonne correspond à la moyenne d'expériences indépendantes (N = 2), la barre d'erreur correspond à l'écart moyen absolu, la comparaison entre les valeurs est effectuée par le test de Student (NS : non significatif ($p > 0,5$)))

Pour commencer, l'expression de base de l'ARNm de l'angiotensinogène est obtenue afin de démontrer que tous les clones expriment bien le gène de l'angiotensinogène. Les différents clones ont été cultivés dans un milieu *DMEM* (Invitrogen) qui a une concentration normale en glucose (5 mM) additionné de 5% de sérum fœtal de bovin (FBS). L'intensité de la bande des IRPTC non-transformés est déterminée de façon arbitraire comme étant 100%. Cette valeur a servi de référence pour l'attribution d'une valeur aux autres composantes du graphique selon l'intensité relative des bandes. Les IRPTC transformés par le plasmide contrôle (pcDNA3.1) ont un niveau d'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène qui est statistiquement semblable à celui des IRPTC non-transformés. Cela démontre que la transformation des cellules avec un plasmide ne contenant pas d'insert n'affecte pas la production cellulaire d'angiotensinogène. Pour ce qui est des différents clones de PKC β 1, leurs niveaux d'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène sont semblables entre eux. Ils semblent plus bas que celui du contrôle (moins de 60%), mais ces valeurs ne sont pas statistiquement significatives. Par contre, l'écart moyen absolu est assez élevé pour les deux contrôles ce qui ne permet pas de tirer une conclusion définitive. Pour conclure que l'expression de l'angiotensinogène est réduite dans les clones DN-PKC β 1 par rapport aux contrôles, l'expérience devra être répétée afin de diminuer l'écart moyen absolu.

L'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène a encore été évaluée par RT-PCR suivit d'une analyse de *Southern*. Les cellules contrôles ont été cultivées dans le milieu *DMEM* à 5 mM de glucose sans FBS pendant 16 h. Puis elles sont cultivées dans le milieu à 5 ou 25 mM de glucose additionné de 1 % de dFBS pendant 24 h. L'addition du GF 109203X a été effectuée avant le changement de milieux pour celui ayant une concentration de 25 mM de glucose. Le GF 109203X a été ajouté a

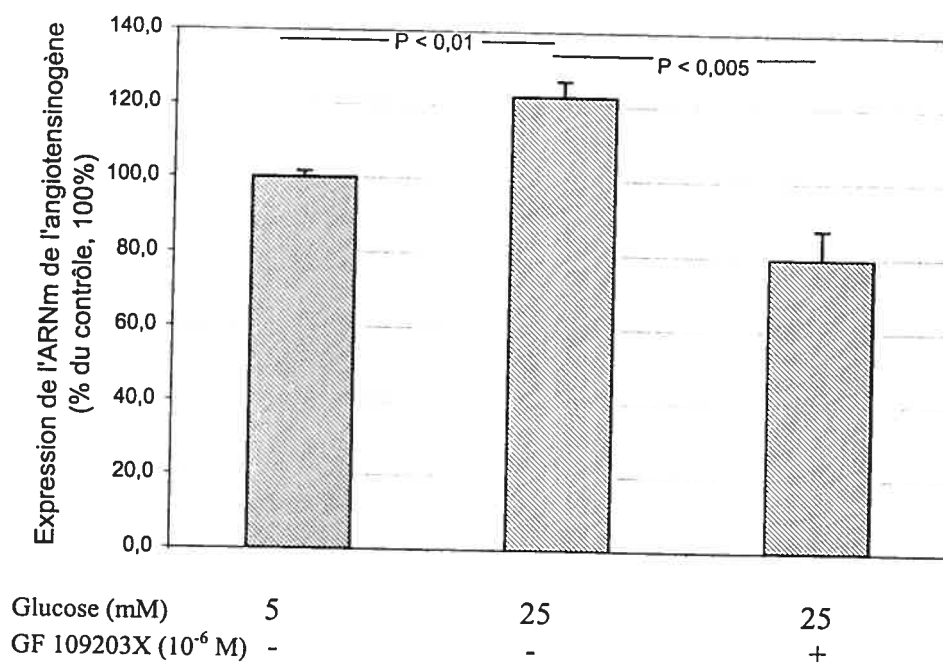


Figure 4.6: Effet de la concentration en glucose sur l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les IRPTC contrôles (pcDNA3.1). La protéine β -actine sert de contrôle interne. (Chaque colonne correspond à la moyenne d'expériences indépendantes ($N = 3$), la barre d'erreur correspond à l'écart moyen absolu, la comparaison entre les valeurs est effectuée par le test de Student)

du milieu *DMEM* contenant 5 mM de glucose et additionné de 1 % de dFBS pour une incubation de 30 minutes. Ensuite, le milieu a été changé pour celui contenant 25 mM de glucose plus 1 % de dFBS et 1×10^{-6} M de GF 109203X. Le niveau d'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène des cellules contrôles cultivées dans le milieu ayant une concentration de 5 mM en glucose est désigné arbitrairement comme étant 100%. Lorsque les cellules contrôles ont été cultivées en présence d'une concentration élevée en glucose (25 mM), cela a causé une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène de l'ordre de 20%. L'inhibiteur des PKC (GF 109203X) entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène de l'ordre de 40% comparativement aux cellules cultivées seulement en présence de 25 mM de glucose.

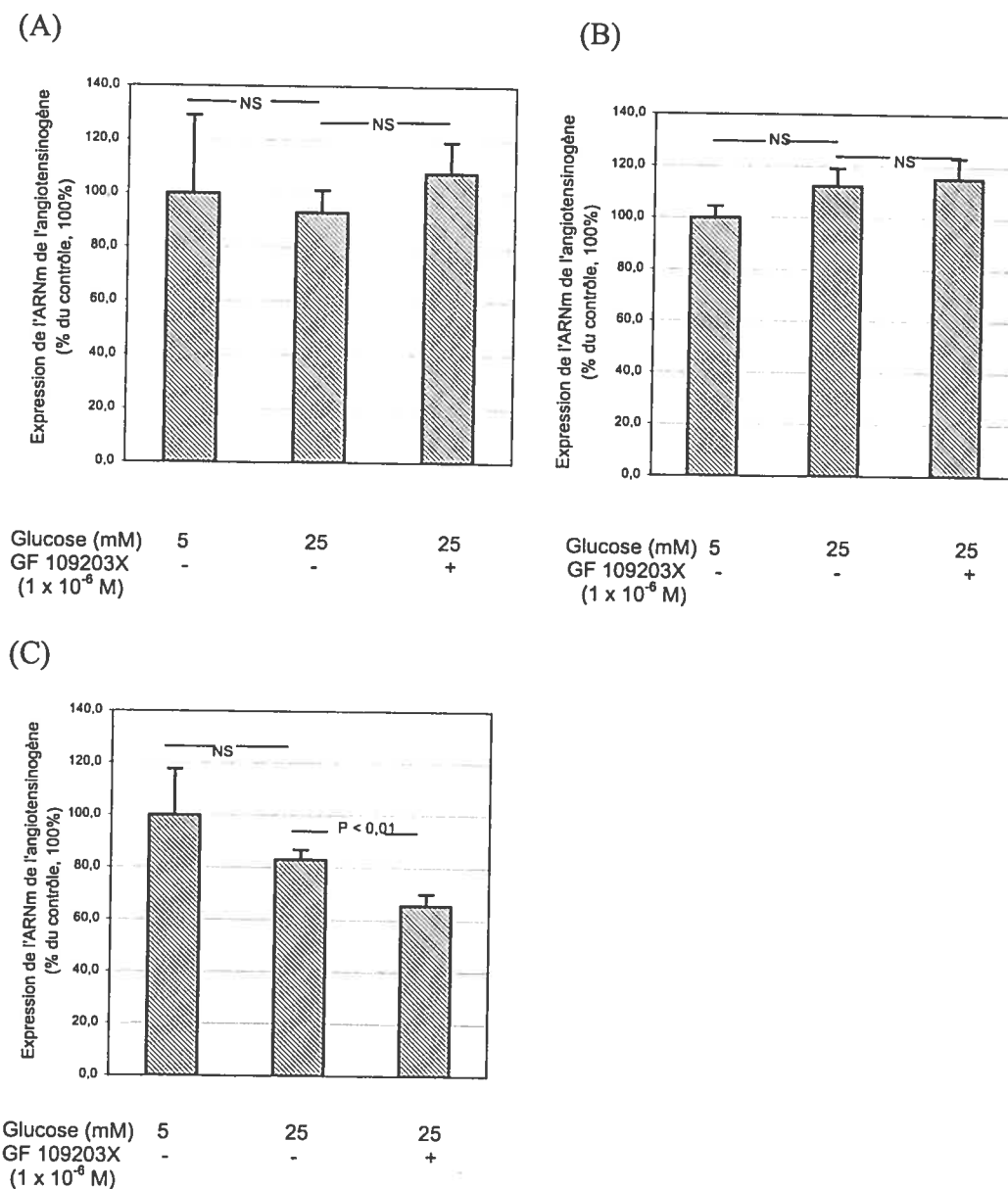


Figure 4.7: Expression de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les clones DN-PKC β 1. (A): DN-PKC β 17, (B): DN-PKC β 20, (C): DN-PKC β 24. L'effet d'une concentration élevée en glucose et du GF 109203X sur l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène a été déterminé par RT-PCR. La protéine β -actine sert de contrôle interne. (Chaque colonne correspond à la moyenne d'expériences indépendantes (N = 3), la barre d'erreur correspond à l'écart moyen absolu, la comparaison entre les valeurs est effectuée par le test de Student (NS : non significatif ($p > 0,5$)))

Les trois clones de DN-PKC β 1 ont été cultivées dans des conditions physiologique de glucose (5 mM) (figure 4,7), puis en présence d'une concentration élevée en glucose (25 mM). Contrairement à ce qui est observé chez les IRPTC contrôles, cela n'a causé aucune augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène. Dans ces clones, l'expression de protéines DN-PKC β 1, qui n'ont pas de site catalytique actif, empêche les protéines PKC β 1 de la cellule d'effectuer leur action normale en prenant leur place. Cela permet de déduire que PKC β 1 joue un rôle important dans l'augmentation de l'angiotensinogène dû au glucose, puisque l'augmentation est contrée. Lorsqu'un inhibiteur des PKC est utilisé (GF 109203X), encore une fois, aucune modification de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène n'est observée.

4.3 Implication de PKC β 1 dans l'hypertrophie des IRPTC

Le niveau d'expression de la protéine p27^{Kip1} est un bon indicateur de l'hypertrophie cellulaire dans les tubules proximaux (PREISIG 1999, WOLF 2003b) et chez les IRPTC. Son niveau est déterminé par un *Western*. Brièvement, après avoir été synchronisées pour la nuit dans le milieu *DMEM* à 5 mM de glucose sans FBS, les IRPTC ont été cultivées dans un milieu *DMEM* contenant soit 5 mM ou 25 mM de glucose additionné de 1 % de dFBS pendant 4 h. Le cas échéant, les cellules ont été pré-incubées avec l'inhibiteur des PKC le GF 109203X à 1×10^{-6} M dans le milieu à 5 mM de glucose plus 1 % de dFBS pendant 30 minutes. Puis le milieu est changé pour du milieu à 25 mM plus 1 % de dFBS contenant toujours du GF 109203X pour 4 h. Ensuite, les cellules ont été lysées avec un tampon qui sert de tampon de chargement pour le gel *SDS-PAGE*. Ensuite, un *Western* est effectué à l'aide de l'anticorps monoclonal contre p27^{Kip1} (Transduction Laboratories). Après la migration sur gel, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) hydrophobe (*Hybond P* d'Amersham). Ensuite, la membrane a été bloquée dans une solution de saline tamponnée au tris contenant 0,1 % de Tween-20 (TBS-T) additionnée de 5% de lait écrémé en poudre pour 1 h. Puis l'anticorps dirigé contre p27^{Kip1} a été ajouté et l'incubation a été poursuivie pour toute la nuit. Le lendemain, après trois lavages de 10 minutes au TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dans une solution de TBS-T additionnée de 5% de lait écrémé en poudre pour 1 h. Cet anticorps est dirigé contre l'anticorps primaire. Le complexe ainsi formé peut être visualisé grâce au substrat chimiluminescent de la peroxydase. Le substrat utilisé est le *Lumi-light* de Roche. Pour normaliser la quantité de protéines appliquée dans chaque puits l'anticorps contre la protéine β -actine (Sigma) a été utilisé comme contrôle interne. Le ratio de l'expression de p27^{Kip1} et β -actine a été effectué. Le niveau d'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène des cellules contrôles cultivées dans le milieu

ayant une concentration de 5 mM en glucose est désigné arbitrairement comme étant 100%.

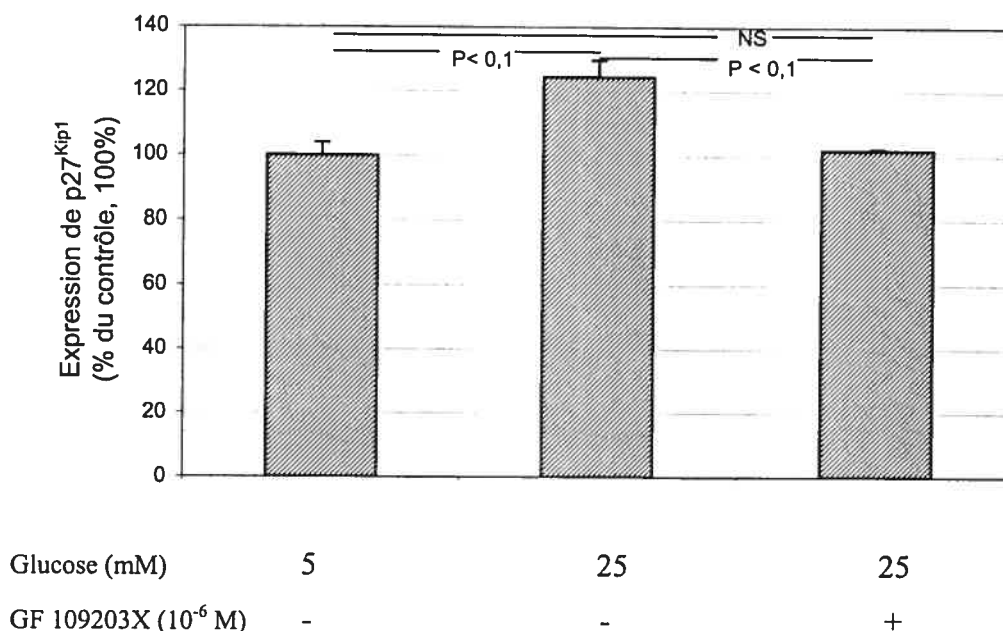


Figure 4.8 : Expression de p27^{Kip1} dans les IRPTC contrôles. L'effet d'une concentration élevée en glucose et du GF 109203X sur l'expression de p27^{Kip1} à été déterminé par un *Western*. La protéine β -actine sert de contrôle interne. (Chaque colonne correspond à la moyenne d'expériences indépendantes (N = 4), la barre d'erreur correspond à l'écart moyen absolu, la comparaison entre les valeurs est effectuée par le test de Student (NS : non significatif ($p > 0,5$)))

Pour commencer, l'expression de p27^{Kip1} est déterminée dans les cellules contrôles (figure 4,8). L'addition de glucose (milieu à 25 mM comparativement au milieu à 5 mM) cause une augmentation significative de l'expression de p27^{Kip1} de l'ordre de 25%. Comme p27^{Kip1} sert de marqueur pour l'hypertrophie cellulaire, son augmentation permet de croire à l'hypertrophie de ces cellules dans des conditions d'hyperglycémie. Pour sa part, l'addition de GF 109203X permet de renverser cette augmentation. En effet, lors de l'utilisation du milieu de culture contenant 25 mM de glucose plus 1×10^{-6} M de GF 109203X, le niveau d'expression de p27^{Kip1} est semblable à celui observé lors de la culture avec un milieu contenant 5 mM de glucose. Ainsi le GF 109203X contre l'effet d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de p27^{Kip1}.

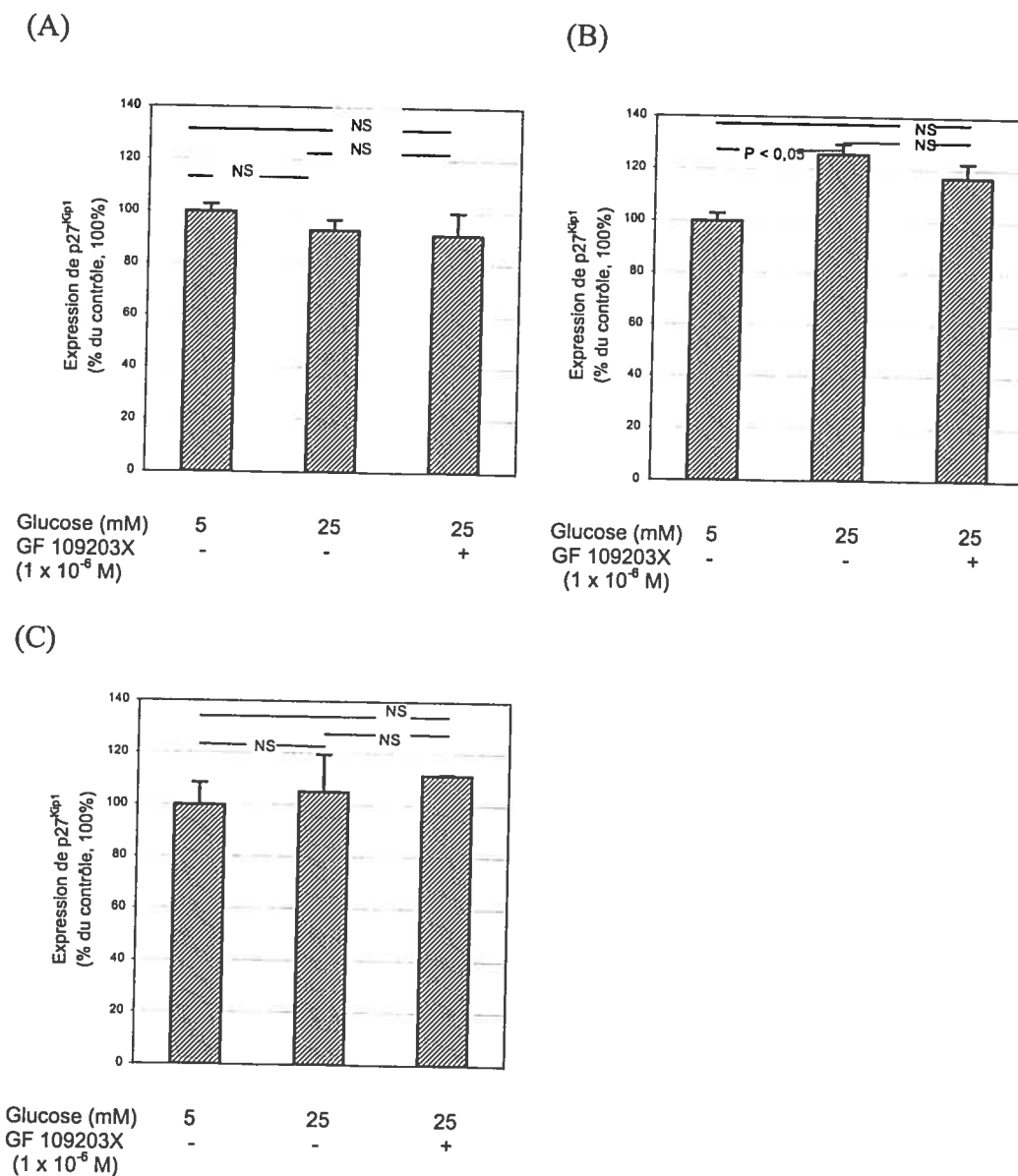


Figure 4.9 : Expression de p27^{Kip1} dans les clones DN-PKCβ1. (A) : DN-PKCβ17, (B) : DN-PKCβ20, (C) : DN-PKCβ24. L'effet d'une concentration élevée en glucose et du GF 109203X sur l'expression de p27^{Kip1} a été déterminé par *Western*. La protéine β-actine sert de contrôle interne. (Chaque colonne correspond à la moyenne d'expériences indépendantes (N = 4), la barre d'erreur correspond à l'écart moyen absolu, la comparaison entre les valeurs est effectuée par le test de Student (NS : non significatif (p > 0,5)))

L'expérience a été répétée avec les trois clones DN-PKC β 1 (figure 4,9). Pour ce qui est de DN-PKC β 17, la culture en condition d'hyperglycémie et l'addition de GF 109203X n'ont eu aucun effet. En effet, les trois niveaux sont très près du 100%. Donc, dans ce clone l'augmentation de la concentration de glucose n'augmente plus l'expression de p27^{Kip1} (contrairement à ce qui se passe dans les cellules contrôles). DN-PKC β 20, pour sa part, démontre un schéma d'expression de p27^{Kip1} plus semblable à celui du contrôle. En effet, la culture de ces cellules en condition hyperglycémique augmente l'expression de la protéine p27^{Kip1}. Le troisième clone, DN-PKC β 24, agit de façon semblable au premier clone (DN-PKC β 17).

5. Discussion et conclusion

Cette étude démontre que l'action d'une concentration élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène et l'hypertrophie des IRPTC passe, au moins en partie, par PKC β 1.

Il a été démontré que les isoformes α et β 1 de la PKC sont présent dans les tubules proximaux, alors que l'isoforme β 2, n'est pas exprimé dans cette partie du rein (PFAFF 1999). Donc la PKC α et β 1 doivent jouer un rôle physiologique important dans les tubules proximaux. Il n'est pas clairement établi lequel des deux isoformes de la PKC β est présent dans les IRPTC. En effet, ils sont le produit d'épissage alternatif (ONO 1986). Ils sont donc difficiles à différencier par un *Western*, car ils ont des séquences très semblables qui diffèrent seulement de quelques acides aminés au niveau de la partie C-terminale. Ils peuvent donc être les deux présents puisqu'ils sont produits à partir du même gène. Par contre, l'étude de Pfaff démontre que l'isoforme β 1 est présent dans les tubules proximaux chez le rat et pas l'isoforme β 2. Cela permet de supposer que c'est la même chose pour les IRPTC. Des études supplémentaires pour déterminer quels sont les isoformes de la PKC qui sont réellement présent dans les IRPTC seraient nécessaires.

Pour étudier l'effet de PKC β 1 dans les IRPTC une ligné cellulaire qui exprime le dominant négatif de cette protéine à été établie. Un *Western* démontre que les protéines DN-PKC β 1 sont bien exprimées dans ces lignées cellulaires (figure 4.4). Comme les protéines surexprimées ont un site catalytique inactivé par une mutation, elles empêchent les PKC β 1 d'effectuer leurs actions normales dans ces lignées cellulaires (BANDYOPADHYAY 1999). Donc, elles sont un excellent modèle pour étudier l'action de la PKC β 1 dans différentes situations. Par contre, aucune étude de l'activité de la PKC β 1 n'a été effectuée pour les clones DN-

PKC β 1 obtenus. Une bonne façon de vérifier si les DN-PKC β 1 empêchent bien l'activation des PKC β 1 aurait été de faire une extraction des membranes et des cytosols des cellules, puis de faire un *Western* ou alors d'effectuer un assai d'activité à l'aide d'un ensemble disponible dans le commerce. Cela aurait permis de vérifier l'activation des PKC (transport vers les membranes). Cette étude aurait permis de vérifier que l'expression des protéines DN-PKC β 1 bloque l'action des PKC β 1 endogènes. Il a été présumé que l'expression des protéines DN-PKC β 1 était suffisante pour annuler l'effet de la PKC β 1 parce que cette construction a déjà été utilisée dans d'autres lignées cellulaires et qu'elle fonctionnait bien (BANDYOPADHYAY 1999). Par contre, il est vrai qu'une étude de l'activation permettrait de mieux confirmer l'efficacité de ces clones et donc serait nécessaire afin de démontrer l'exactitude des conclusions. Cette étude aurait également permis de vérifier si le clone DN-PKC β 20 possède un niveau d'expression suffisant pour inactiver complètement les PKC β 1 ou si une activité résiduelle est présente. En effet, le niveau d'expression des protéines DN-PKC β 1 (figure 4.4 puits 4) du clone 20 est moindre que celui des deux autres clones. Par contre, rien n'est connu au niveau de son activité des PKC, donc on ne peut conclure avec certitude qu'il est moins efficace que les clones DN-PKC β 17 et 24. Il faudrait également vérifier si les autres isoformes de la PKC sont bloqués par le DN-PKC β 1 avant de conclure que c'est la PKC β 1 qui est responsable des effets observés.

L'expression de base de l'ARNm de l'angiotensinogène a été étudiée pour déterminer si la PKC β 1 y est impliquée. Elle est plus basse pour les clones DN-PKC β 1 (figure 4.5), mais cette différence n'est pas significative, puisque l'écart moyen absolu pour le contrôle est trop élevé. En effet, une grande variabilité a été observée pour l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène dans les cellules contrôle, donc cette expérience devrait être répétée un plus grand nombre de fois afin de diminuer la variation d'une expérience à l'autre. Ceci permettrait de tirer

une conclusion valable sur diminution de l'expression de l'angiotensinogène dans les clones DN-PKC β 1. Cette diminution (si elle est significative) est intéressante, puis qu'elle démontre que la PKC β 1 joue un rôle important pour l'expression normale de l'angiotensinogène. Ce qui en fait un bon candidat pour expliquer le dérèglement de l'expression de l'angiotensinogène en condition pathologique (hyperglycémie). Il a déjà été démontré que la PKC joue un rôle dans l'expression du gène de l'angiotensinogène en condition d'hyperglycémie (ZHANG 2001). Par contre, les isoformes en cause n'ont pas été identifiées.

Les cellules contrôles ont été cultivées en condition normale puis d'hyperglycémie (25 mM de glucose) et finalement, en condition d'hyperglycémie plus du GF 109203X (figure 4.6). Il est déjà connu que l'augmentation de la concentration en glucose cause l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène chez les IRPTC (ZHANG 2001). L'addition de GF 109203X permet de démontrer que les PKC jouent un rôle important dans l'activation de l'expression de l'angiotensinogène. En effet, cette substance est un inhibiteur des PKC et son addition entraîne une baisse de la production de l'angiotensinogène. Son action est tellement efficace que non seulement elle contre l'effet du glucose, mais de plus le niveau d'ARNm de l'angiotensinogène diminué d'autant plus dans les cellules cultivée en conditions normales (5 mM de glucose). Cela suggère que les PKC jouent un rôle tant au niveau de l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène en condition d'hyperglycémie qu'au niveau de l'expression basale de ce gène.

Pour ce qui est des trois clones DN-PKC β 1, ils ont été cultivés dans les mêmes conditions (figure 4.7) afin de déterminer si ce sont les PKC β 1 qui jouent un rôle dans l'augmentation de la quantité d'angiotensinogène exprimée. Pour ce qui est des clones DN-PKC β 17 et 24 (figure 4.7 A et C respectivement) cela a très bien fonctionné. C'est-à-dire que l'on ne perçoit pas d'augmentation en présence d'une concentration de 25 mM de glucose contrairement à ce qui est observé pour le

contrôle. Donc, l'augmentation de l'expression du gène de l'angiotensinogène en condition d'hyperglycémie passe bel et bien par l'action des PKC β 1. Pour ce qui est de la lignée cellulaire DN-PKC β 20, il est clair qu'elle n'exprime pas les protéines DN-PKC β 1 au même niveau que les deux autres (figure 4.4), ce qui expliquerait sa moins bonne performance quand vient le temps de bloquer l'effet de la concentration élevée en glucose sur l'expression de l'angiotensinogène. Effectivement, pour cette lignée cellulaire l'augmentation à 25 mM de glucose cause une légère augmentation de l'expression de l'angiotensinogène (figure 4,7 B). Par contre, cette augmentation demeure non significative. Il est donc fort probable qu'avec une expression plus importante des DN-PKC β 1, l'action endogène de ces protéines serait mieux bloquée et un patron semblable à celui observé pour les deux autres lignées cellulaires serait également observé. Ce résultat n'est donc pas contradictoire avec la conclusion que la PKC β 1 joue un rôle dans l'augmentation de l'expression du gène de l'angiotensinogène en condition d'hyperglycémie.

La culture des cellules contrôles en présence de 25 mM glucose entraîne une hypertrophie qui est mesurée par l'augmentation de l'expression de p27^{Kip1} (figure 4.8). L'addition de GF 109203X permet de contrer cette augmentation. Cela démontre que les PKC jouent un rôle important pour l'expression de p27^{Kip1} et pour l'hypertrophie des IRPTC. L'expression de p27^{Kip1} est associée à l'hypertrophie chez les cellules murines de tubules proximaux (WOLF 2003) et chez les IRPTC, par contre ce n'est pas une mesure de l'hypertrophie. Donc pour vérifier que l'augmentation de l'expression de p27^{Kip1} est bien liée à l'hypertrophie, une mesure directe de l'hypertrophie cellulaire devrait être utilisée comme la cytométrie en flux ou le contenu en protéine de la cellule. Ces deux mesures ont été utilisées dans le passé en association avec l'expression de p27^{Kip1} et ont servi à démontrer qu'une concentration élevée en glucose entraîne une hypertrophie des IRPTC (ZHANG 2002). Et comme l'expression de p27^{Kip1} est ici aussi liée à la concentration de glucose c'est ce qui permet de penser que c'est un

marqueur de l'hypertrophie des IRPTC. En effet, pour les lignées cellulaires DN-PKC β 17 et 24 (figure 4.9 A et C respectivement) l'expression de p27^{Kip1} n'est plus stimulée par l'augmentation de la concentration en glucose. Pour ce qui est du clone DN-PKC β 20 (figure 4.9 B), la même chose que pour l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène se produit. C'est-à-dire que l'expression des protéines DN-PKC β 1 n'est pas assez forte pour bloquer complètement l'action du glucose. L'augmentation de l'expression de p27^{Kip1} est donc tout de même observable. Malgré cela, les expériences avec les deux autres clones démontrent bien que l'expression de p27^{Kip1} passe par l'activation de la PKC β 1. Donc, la PKC β 1 est également importante pour l'hypertrophie stimulée par une concentration élevée en glucose chez les IRPTC. Ces résultats indiquent que le blocage de l'activation du système rénine-angiotensine local du rein par les DN-PKC β 1 est une méthode efficace pour atténuer ou prévenir l'hypertrophie des tubules proximaux de rein provoqué par l'hyperglycémie.

Il a été démontré dans le passé que l'angiotensine II médie l'effet du glucose sur la taille des cellules et le contenu en protéine des IRPTC (ZHANG 2002). Et que l'augmentation de la production d'angiotensinogène lors d'hyperglycémie passe via la synthèse *de novo* de diacylglycérol et que les diacylglycérols activent les PKC. La présente étude suggère que c'est l'isoforme β 1 de la PKC qui fait suite à l'augmentation de diacylglycérol, mais cela doit être confirmé, et il faudrait tester les autres isoformes de PKC (ZHANG 2002).

Présentement le mécanisme moléculaire qui produit l'action stimulante de l'hyperglycémie sur l'expression de l'angiotensinogène dans les IRPTC n'est pas connu. Une des possibilités c'est qu'une concentration élevée en glucose induit la phosphorylation de CREB via la voie de signalisation de la PKC β 1, car il a été déjà rapporté que les PKC stimulent la phosphorylation de CREB (KREISBERG 1996). Lorsque CREB est phosphorylé il interagit avec le facteur nucléaire ATF-2

phosphorylé et alors se lie à l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) dans la région 5' du gène de l'angiotensinogène (HSIEH 2003), ce qui augmente son expression. Cette possibilité est supportée par le fait qu'une concentration élevée en glucose augmente la phosphorylation de CREB et ATF-2 dans les IRPTC (HSIEH 2003).

L'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant des DN-PKC β 1 a permis de cerner l'action de la PKC β 1 en conditions d'hyperglycémie. En effet, cette protéine est nécessaire pour l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène en conditions d'hyperglycémie, ainsi que pour l'augmentation de l'expression de p27^{Kip1} qui est un marqueur de l'hypertrophie cellulaire. Donc, bloquer l'action de la PKC β 1 représente une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir ou atténuer l'expression de l'angiotensinogène induite par le glucose et conséquemment le développement de la néphropathie diabétique. Par contre, il reste à déterminer si le blocage à long terme de la PKC β 1 peut être bénéfique pour le traitement de la néphropathie diabétique. Cela demande plus d'expérimentation.

Bibliographie

- Bader, M., et al., *Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research*. J Mol Med, 2001. 79(2-3): p. 76-102.
- Bakris, G.L., et al., *Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group*. Am J Kidney Dis, 2000. 36(3): p. 646-61.
- Barajas, L. and K. Powers, *Innervation of the renal proximal convoluted tubule of the rat*. Am J Anat, 1989. 186(4): p. 378-88.
- Bernstein, K.E., et al., *Signal transduction pathways of angiotensin II in the kidney*. Contrib Nephrol, 2001(135): p. 16-33.
- Bohle, A., *The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis*. Pathol Res Pract, 1991. 187(2-3): p. 9.
- Bonnet, F., Z. Cao, and M.E. Cooper, *Apoptosis and angiotensin II: yet another renal regulatory system?* Exp Nephrol, 2001. 9(5): p. 295-300.
- Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. 414(6865): p. 813-20.
- Burson, J.M., et al., *Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse*. Am J Physiol, 1994. 267(2 Pt 1): p. E260-7.
- Capasso, G., et al., *Tubule effects of glomerular hyperfiltration: an integrated view*. Semin Nephrol, 1995. 15(5): p. 419-25.
- Chan, J.S., et al., *Molecular cloning and expression of the rat angiotensinogen gene*. Pediatr Nephrol, 1990. 4(4): p. 429-35.
- Chen, X., et al., *Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin*. Endocrinology, 2001. 142(6): p. 2577-85.
- Christlieb, A.R., A. Kaldany, and J.A. D'Elia, *Plasma renin activity and hypertension in diabetes mellitus*. Diabetes, 1976. 25(10): p. 969-74.
- Coussens, L., et al., *Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways*. Science, 1986. 233(4766): p. 859-66.

- Cowie, C.C., et al., *Disparities in incidence of diabetic end-stage renal disease according to race and type of diabetes*. N Engl J Med, 1989. **321**(16): p. 1074-9.
- Craven, P.A. and F.R. DeRubertis, *Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1667-75.
- Dekker, L.V. and P.J. Parker, *Protein kinase C--a question of specificity*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(2): p. 73-7.
- Del Prete, D., et al., *Molecular biology of diabetic glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13** (Suppl 8): p. 20-5.
- Dong, L.Q., J.L. Stevens, and S. Jaken, *Biochemical and immunological characterization of renal protein kinase C*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. F679-87.
- Ehmke, H., et al., *Resetting of pressure-dependent renin release by intrarenal alpha 1-adrenoceptors in conscious dogs*. Pflugers Arch, 1989. **413**(3): p. 261-6.
- Erdbrugger, W., et al., *Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(2): p. 177-86.
- Floege, J., et al., *Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model*. Kidney Int, 1992. **41**(2): p. 297-309.
- Friedlander, M.A. and D.E. Hricik, *Optimizing end-stage renal disease therapy for the patient with diabetes mellitus*. Semin Nephrol, 1997. **17**(4): p. 331-45.
- Gallinat, S., et al., *The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(3): p. E357-74.
- Gougoux, A., *La physiologie du rein et des liquides corporels*. 1999, Montréal: Éditions G. Morin. 266.
- Haneda, M., et al., *Cellular mechanisms in the development and progression of diabetic nephropathy: activation of the DAG-PKC-ERK pathway*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4 Suppl 1): p. S178-81.
- Hannken, T., et al., *Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals*. Kidney Int, 1998. **54**(6): p. 1923-33.

- Hannken, T., et al., *Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27(Kip1): role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(8): p. 1387-97.
- Harris, M.I., et al., *Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Diabetes Care, 1998. **21**(4): p. 518-24.
- Hsieh, T.J., et al., *High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells*. Endocrinology, 2002. **143**(8): p. 2975-85.
- Huang, W., et al., *Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13330-4.
- Hug, H. and T.F. Sarre, *Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?* Biochem J, 1993. **291** (Pt 2): p. 329-43.
- Idris, I., S. Gray, and R. Donnelly, *Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes*. Diabetologia, 2001. **44**(6): p. 659-73.
- Ingelfinger, J.R. and V.J. Dzau, *Molecular biology of renal injury: emphasis on the role of the renin-angiotensin system*. J Am Soc Nephrol, 1991. **2**(2 Suppl 1): p. S9-20.
- Ingelfinger, J.R., et al., *Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 2): p. F218-27.
- Ishii, H., et al., *Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor*. Science, 1996. **272**(5262): p. 728-31.
- Jardine, A.G., N. Padmanabhan, and J.M. Connell, *Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and renal disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1998. **7**(3): p. 259-64.
- Kagami, S., et al., *Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2431-7.
- Kelly, D.J., et al., *Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-angiotensin system in diabetic Ren-2 rats*. Kidney Int, 2002. **61**(1): p. 31-9.

- Kelly, D.J., et al., *Protein kinase C beta inhibition attenuates the progression of experimental diabetic nephropathy in the presence of continued hypertension*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 512-8.
- Keogh, R.J., M.E. Dunlop, and R.G. Larkins, *Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation*. Metabolism, 1997. **46**(1): p. 41-7.
- Kikkawa, R., et al., *Progression of diabetic nephropathy*. Am J Kidney Dis, 2003. **41** (3 Suppl 1): p. S19-21.
- Klahr, S., G. Schreiner, and I. Ichikawa, *The progression of renal disease*. N Engl J Med, 1988. **318**(25): p. 1657-66.
- Koya, D., et al., *Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes*. Faseb J, 2000. **14**(3): p. 439-47.
- Koya, D. and G.L. King, *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 859-66.
- La Porta, C.A. and R. Comolli, *Biochemical and immunological characterization of calcium-dependent and -independent PKC isoenzymes in renal ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **191**(3): p. 1124-30.
- Laczi, F., *[Diabetes insipidus: etiology, diagnosis, and therapy]*. Orv Hetil, 2002. **143**(46): p. 2579-85.
- Lavoie, J.L. and C.D. Sigmund, *Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2179-83.
- Lewis, E.J., et al., *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy*. The Collaborative Study Group. N Engl J Med, 1993. **329**(20): p. 1456-62.
- Liao, Y. and A. Husain, *The chymase-angiotensin system in humans: biochemistry, molecular biology and potential role in cardiovascular diseases*. Can J Cardiol, 1995. **11 Suppl F**: p. 13F-19F.
- Lote, C.J., *Principles of renal physiology*. 4th ed. 2000, Boston: Kluwer Academic Publishers. 203.
- Manns, B.J., K.J. Taub, and C. Donaldson, *Economic evaluation and end-stage renal disease: from basics to bedside*. Am J Kidney Dis, 2000. **36**(1): p. 12-28.

- Maric, C., et al., *Angiotensin II inhibits growth of cultured embryonic renomedullary interstitial cells through the AT2 receptor*. *Kidney Int*, 1998. **53**(1): p. 92-9.
- Martins, D. and K. Norris, *Combating diabetic nephropathy with drug therapy*. *Curr Diab Rep*, 2001. **1**(2): p. 148-56.
- Menard, J., *Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists*. *J Hypertens Suppl*, 1993. **11**(3): p. S3-11.
- Menne, J., et al., *Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C-alpha-deficient diabetic mice*. *Diabetes*, 2004. **53**(8): p. 2101-9.
- Mogensen, C.E., et al., *Renal factors influencing blood pressure threshold and choice of treatment for hypertension in IDDM*. *Diabetes Care*, 1991. **14 Suppl 4**: p. 13-26.
- Morris, B.J., et al., *Human renin gene sequence, gene regulation and prorenin processing*. *J Hypertens Suppl*, 1984. **2**(3): p. S231-3.
- Murao, K., et al., *Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18959-65.
- Nagahama, T., et al., *Role of protein kinase C in angiotensin II-induced constriction of renal microvessels*. *Kidney Int*, 2000. **57**(1): p. 215-23.
- Nangaku, M., *Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure*. *Intern Med*, 2004. **43**(1): p. 9-17.
- Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
- Nishiyama, A., D.M. Seth, and L.G. Navar, *Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats*. *Hypertension*, 2002. **39**(1): p. 129-34.
- Nishizuka, Y., *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion*. *Nature*, 1984. **308**(5961): p. 693-8.
- Nishizuka, Y., *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C*. *Science*, 1992. **258**(5082): p. 607-14.
- O'Bryan, G.T., et al., *The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy*. *Semin Nephrol*, 1997. **17**(2): p. 93-100.

- Olivarius Nde, F., et al., *Epidemiology of renal involvement in newly-diagnosed middle-aged and elderly diabetic patients. Cross-sectional data from the population-based study "Diabetes Care in General Practice", Denmark.* Diabetologia, 1993. **36**(10): p. 1007-16.
- Ono, Y., et al., *Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. Heterogeneity determined by alternative splicing.* FEBS Lett, 1986. **206**(2): p. 347-52.
- Osicka, T.M., et al., *Aminoguanidine and ramipril prevent diabetes-induced increases in protein kinase C activity in glomeruli, retina and mesenteric artery.* Clin Sci, 2001. **100**(3): p. 249-57.
- Paillard, M., *Physiologie rénale et désordres hydroélectrolytiques.* 1992, Paris: Hermann. 304.
- Perazella, M.A. and J.F. Setaro, *Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders.* J Nucl Cardiol, 2003. **10**(2): p. 184-96.
- Perez, G.O., et al., *Hyporeninemia and hypoaldosteronism in diabetes mellitus.* Arch Intern Med, 1977. **137**(7): p. 852-5.
- Pfaff, I.L., H.J. Wagner, and V. Vallon, *Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes alpha, beta1 and betaII in rat kidney.* J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(9): p. 1861-73.
- Philippe, J., *Insulin regulation of the glucagon gene is mediated by an insulin-responsive DNA element.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7224-7.
- Phillips, A.O., *The role of renal proximal tubular cells in diabetic nephropathy.* Curr Diab Rep, 2003. **3**(6): p. 491-6.
- Phillips, A.O., et al., *Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury.* Histol Histopathol, 2002. **17**(1): p. 247-52.
- Preisig, P., *A cell cycle-dependent mechanism of renal tubule epithelial cell hypertrophy.* Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1193-8.
- Price, D.A. and N.K. Hollenberg, *Angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy.* Curr Diab Rep, 2001. **1**(3): p. 267-74.

- Ravid, M., et al., *Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia*. Arch Intern Med, 1998. **158**(9): p. 998-1004.
- Reid, I.A., *The renin-angiotensin system and body function*. Arch Intern Med, 1985. **145**(8): p. 1475-9.
- Seikaly, M.G., B.S. Arant, Jr., and F.D. Seney, Jr., *Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat*. J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1352-7.
- Sharma, K. and F.N. Ziyadeh, *Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator*. Diabetes, 1995. **44**(10): p. 1139-46.
- Taft, J.L., et al., *Clinical and histological correlations of decline in renal function in diabetic patients with proteinuria*. Diabetes, 1994. **43**(8): p. 1046-51.
- Taugner, R., et al., *Immunoreactive renin and angiotensin II in the afferent glomerular arterioles of rats with hypertension due to unilateral renal artery constriction*. Histochemistry, 1982. **76**(1): p. 61-9.
- Tobian, L., S. Perry, and J. Mork, *The relationship of the juxtaglomerular apparatus to sodium retention in experimental nephrosis*. Ann Intern Med, 1962. **57**: p. 382-8.
- Toke, A. and T.W. Meyer, *Hemodynamic effects of angiotensin II in the kidney*. Contrib Nephrol, 2001(135): p. 34-46.
- Tuttle, K.R., et al., *A novel potential therapy for diabetic nephropathy and vascular complications: protein kinase C beta inhibition*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(3): p. 456-65.
- Urata, H. and D. Ganten, *Cardiac angiotensin II formation: the angiotensin-I converting enzyme and human chymase*. Eur Heart J, 1993. **14 Suppl I**: p. 177-82.
- van Kats, J.P., et al., *Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production*. Kidney Int, 2001. **60**(6): p. 2311-7.
- Vander, A.J., *Control of renin release*. Physiol Rev, 1967. **47**(3): p. 359-82.
- White, K.E., et al., *Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1667-73.

- Wolf, G., *Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney*. Miner Electrolyte Metab, 1998. 24(2-3): p. 174-80.
- Wolf, G., U. Butzmann, and U.O. Wenzel, *The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology*. Nephron Physiol, 2003a. 93(1): p. P3-13.
- Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1*. Kidney Int, 2003b. 64(1): p. 71-81.
- Wolf, G., P.D. Killen, and E.G. Neilson, *Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells*. Cell Regul, 1991. 2(3): p. 219-27.
- Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1993. 92(3): p. 1366-72.
- Wolf, G. and E.G. Neilson, *Cellular biology of tubulointerstitial growth*. Curr Top Pathol, 1995b. 88: p. 69-97.
- Wolf, G. and R.A. Stahl, *Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK1 cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1*. Kidney Int, 1996. 50(6): p. 2112-9.
- Wolf, G., et al., *Angiotensin II induces p27(Kip1) expression in renal tubules in vivo: role of reactive oxygen species*. J Mol Med, 2001. 79(7): p. 382-9.
- Wolf, G., et al., *ANG II is a mitogen for a murine cell line isolated from medullary thick ascending limb of Henle's loop*. Am J Physiol, 1995a. 268(5 Pt 2): p. F940-7.
- Wolf, G., *New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology*. Eur J Clin Invest, 2004. 34(12): p. 785-96.
- Xia, P., et al., *Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia*. Diabetes, 1994. 43(9): p. 1122-9.
- Yamada, T., M. Horiuchi, and V.J. Dzau, *Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(1): p. 156-60.
- Zhang, S.L., et al., *Insulin inhibits angiotensinogen gene expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells*. Endocrinology, 1999a. 140(11): p. 5285-92.

- Zhang, S.L., et al., *Hyperglycemia induces insulin resistance on angiotensinogen gene expression in diabetic rat kidney proximal tubular cells*. J Endocrinol, 2002. **172**(2): p. 333-44.
- Zhang, S.L., et al., *Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells*. Kidney Int, 1999b. **55**(2): p. 454-64.
- Zhang, S.L., et al., *High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4637-46.
- Zhang, S.L., et al., *Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells*. Exp Nephrol, 2001. **9**(2): p. 109-17.
- Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
- Zisman, L.S., *ACE and ACE2: a tale of two enzymes*. Eur Heart J, 2005. **26**(4): p. 322-4.
- Ziyadeh, F.N., *The extracellular matrix in diabetic nephropathy*. Am J Kidney Dis, 1993. **22**(5): p. 736-44.

Annexe 1

Nom de l'amorce	Séquence (5' à 3')	Nucléotides
Angiotensinogène de rat sens	CCT CGC TCT CTG GAC TTA TC	+676 Å +695 de l'ADNc
Angiotensinogène de rat antisens	CAG ACA CTG AGG TGC TGT TG	+882 Å +901 de l'ADNc
β-actine sens	ATG CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG C	+155 Å +179 de l'exon 3
β-actine antisens	AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG G	+115 Å +139 de l'exon 5

Nom de la sonde	Séquence (5' à 3')	Nucléotides
Angiotensinogène de rat	GAG GGG GTC AGC ACG GAC AGC ACC	+775 Å +798 de l'ADNc
β-actine	TCC TGT GGC ATC CAT GAA ACT ACA TTC	+9 Å +35 de l'exon 4

